

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Influence du dimorphisme sexuel et du polymorphisme enzymatique de
l'ALDH2 sur la cinétique sanguine de l'éthanol et sur les effets pulmonaires
chez le rat Sprague-Dawley exposé à des vapeurs d'éthanol**

par
Andrea Scarino

Département de santé environnementale et santé au travail
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en
Santé environnementale et santé au travail

Décembre, 2005

©Andrea Scarino, 2005



WA

5

U58

2006

V.014

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Influence du dimorphisme sexuel et du polymorphisme enzymatique de
l'ALDH2 sur la cinétique sanguine de l'éthanol et sur les effets pulmonaires
chez le rat Sprague-Dawley exposé à des vapeurs d'éthanol**

présenté par :
Andrea Scarino

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :
Docteur Joseph Zayed, président-rapporteur,
Docteur Robert Tardif, directeur de recherche,
Docteur Adolf Vyskocil, membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

L'éthanol est une substance de plus en plus utilisée dans les essences dans le but de réduire les émissions de gaz à effet de serre. L'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde, un métabolite toxique. Certaines données suggèrent l'existence de différence dans la façon avec laquelle les femmes et les hommes métabolisent l'éthanol. Quoique certaines études suggèrent que l'exposition humaine involontaire à l'éthanol et à l'acétaldéhyde provoquée par cette utilisation de l'éthanol ne présenterait pas de risque significatif pour la santé, les effets sont inconnus chez les individus qui métabolisent moins bien l'éthanol. Le but de notre étude était de vérifier l'impact du dimorphisme sexuel et du polymorphisme génétique de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley suite à des expositions sous chroniques (13 semaines) à des vapeurs d'éthanol, 6h/j, 5j/sem, sur la cinétique sanguine de l'éthanol et de l'acétaldéhyde et sur certains marqueurs de toxicité pulmonaire. Les résultats montrent que les mâles métabolisent l'éthanol plus rapidement que les femelles; par exemple, suite à une exposition de 6 heures à 1000 ppm d'éthanol, la concentration d'éthanol sanguine moyenne mesurée chez les mâles $ALDH2^{Q/2^Q}$ (activité enzymatique rapide) à 2 minutes suivant la fin de l'exposition était significativement plus faible ($66.76 \pm 10.74 \mu M$) comparativement aux femelles ($87.6 \pm 15.3 \mu M$). Aucune différence n'a été notée en ce qui regarde les concentrations d'acétaldéhyde. Dans l'ensemble, les rats $ALDH2^{Q/2^Q}$, qui sont supposés métaboliser l'acétaldéhyde plus rapidement que les rats $ALDH2^{R/2^R}$ (déficients), avaient des concentrations sanguines d'acétaldéhyde plus basses, mais non significativement différentes. Aucune différence n'a été observée entre les deux lignées pour les concentrations sanguines d'éthanol. Il a aussi été démontré que l'exposition sous chronique s'est traduit par une diminution des concentration sanguines d'éthanol avec le temps; par

exemple, chez les mâles ALDH2^Q/2^Q, la concentration sanguine au temps 2 minutes du jour 1 était de $66.76 \pm 10.74 \mu\text{M}$, alors qu'elle n'était que de $39.88 \pm 7.83 \mu\text{M}$ au jour 85 (exposition à 1000 ppm). L'analyse de la toxicité pulmonaire a été réalisée à l'aide de lavages broncho-alvéolaires et de coupes histologiques des poumons. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes à l'étude. En conclusion, cette étude d'exposition sous chronique à des vapeurs d'éthanol démontre que la valeur de la NOAEL, en ce qui concerne les effets pulmonaires, est de l'ordre de 3000 ppm chez le rat Sprague-Dawley.

Mots-clés : éthanol, acétaldéhyde, inhalation, dimorphisme sexuel, polymorphisme enzymatique, ALDH2, métabolisme.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XIII
1. CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	2
1.1.1. Contexte et problématique.....	2
1.1.2. Mesures prises pour tenter de régler la situation	2
1.2. DONNÉES GÉNÉRALES SUR L'ÉTHANOL.....	4
1.2.1. Propriétés physico-chimiques	4
1.2.2. Origine de l'éthanol.....	5
1.2.2.1. Sources	5
1.2.2.2. Production	5
1.2.2.2.1. Prétraitement de la biomasse	5
1.2.2.2.3. Production d'enzymes et hydrolyse de la cellulose.....	6
1.2.2.2.4. Fermentation du glucose ou du pentose.....	6
1.2.2.2.5. Récupération de l'éthanol	7

1.2.2.2.6. Utilisation de la lignine	7
1.2.2.3. Utilisations	7
1.2.3. Cinétique de l'éthanol dans l'organisme	8
1.2.3.1. Absorption de l'éthanol	8
1.2.3.3. Élimination de l'éthanol	9
1.2.3.3.1. Effet de premier passage	9
1.2.3.3.2. Métabolisme oxydatif de l'éthanol	10
1.2.3.3.3. Métabolisme non oxydatif de l'éthanol	11
1.2.3.4. Excrétion de l'éthanol	12
1.2.3.5. Facteurs influençant la cinétique de l'éthanol	12
1.2.3.5.1. La nourriture	12
1.2.3.5.2. Le genre	13
1.2.4. Effets de l'éthanol dans l'organisme	13
1.2.4.1. Poids corporel	13
1.2.4.2. Pulmonaires	13
1.2.4.3. Cardiaques	14
1.2.4.4. Hépatiques	14
1.2.4.5. Neurologiques	15
1.2.4.6. Cancérigènes	16
1.2.4.7. Reproducteurs	17
1.2.4.8. Métaboliques	18
1.3. DONNÉES GÉNÉRALES SUR L'ACÉTALDÉHYDE	19
1.3.1. Propriétés physico-chimiques	19
1.3.2. Origine de l'acétaldéhyde	20
1.3.2.1. Sources	20

1.3.2.2. Utilisations	20
1.3.3. Cinétique de l'acétaldéhyde dans l'organisme	21
1.3.3.1. Absorption	21
1.3.3.2. Distribution	21
1.3.3.3. Élimination.....	22
1.3.3.3.1. Effet de premier passage.....	22
1.3.3.3.2. Métabolisme de l'acétaldéhyde.....	22
1.3.3.4. Excrétion	23
1.3.4. Effets de l'acétaldéhyde dans l'organisme.....	23
1.3.4.1. Doses intraveineuses	23
1.3.4.2. DL50 et CL50	23
1.3.4.3. Irritants/pulmonaires	24
1.3.4.4. Irritants/cutanés.....	24
1.3.4.5. Gastro-intestinaux	25
1.3.4.6. Neurologiques	25
1.3.4.7. Génétiques/mutagènes	26
1.3.4.8. Reproducteurs.....	27
1.3.4.9. Immunologiques	27
1.3.4.10. Cancérigènes	28
 CHAPITRE DEUXIÈME : OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	 30
2.1. OBJECTIFS	31
2.1.1. Objectif général.....	31
2.1.2. Objectifs spécifiques	31
2.2. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	31

2.2.1. Développement des colonies.....	32
2.3.2. Scénario d'exposition.....	32
2.3.3. Détermination des concentrations d'éthanol et d'acétaldéhyde	32
2.3.4. Préparation des courbes d'étalonnage	33
2.3.5. Évaluation de la toxicité pulmonaire.....	33
CHAPITRE TROISIÈME: PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	34
CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	68
4.1. BUT DE L'ETUDE.....	69
4.2. RESULTATS DES DIFFERENTS OBJECTIFS A L'ETUDE	69
4.2.1. Influence de la durée d'exposition.....	69
4.2.2. Influence du dimorphisme sexuel.....	70
4.2.3. Influence du polymorphisme de l'ALDH2	70
4.2.4. Évaluation de la toxicité pulmonaire.....	71
4.2.5. Comparaison entre les concentrations sanguines à 1000 ppm et 3000 ppm.....	72
CHAPITRE CINQUIÈME : BIBLIOGRAPHIE.....	74

LISTE DES FIGURES

1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES :

FIGURE 1. PROJECTION DES EMISSIONS DE GAZ A EFFET DE SERRE (BLEU) COMPARE AU SCENARIO QUI RESPECTERAIT LES OBJECTIFS ETABLIS PAR LE PROTOCOLE DE KYOTO (ROUGE)	3
FIGURE 2. DIAGRAMME ILLUSTRANT LES DIFFERENTES ETAPES DE PRODUCTION D'ETHANOL.	6
FIGURE 3. PRINCIPALES VOIES METABOLIQUES DE L'ETHANOL.....	11

2. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE :

FIGURE 1. BLOOD ETHANOL CONCENTRATIONS FOR GROUPS $ALDH2^Q/2^Q$ (A) AND GROUPS $ALDH2^R/2^R$ (B) IN MALES (BLUE) AND FEMALES (RED) AT DIFFERENT TIME POINTS (2, 20 AND 40 MIN POST-EXPOSURE). (N = 6) (1000 PPM).....	64
FIGURE 2. BLOOD ACETALDEHYDE CONCENTRATIONS FOR GROUPS $ALDH2^Q/2^Q$ (A) AND GROUPS $ALDH2^R/2^R$ (B) IN MALES (BLUE) AND FEMALES (RED) AT DIFFERENT TIME POINTS (2, 20 AND 40 MIN POST-EXPOSURE). (N = 6) (1000 PPM).....	65
FIGURE 3. BLOOD ETHANOL CONCENTRATIONS FOR GROUPS $ALDH2^Q/2^Q$ (A) AND GROUPS $ALDH2^R/2^R$ (B) IN MALES (BLUE) AND FEMALES (RED) AT DIFFERENT TIME POINTS (2, 20 AND 40 MIN POST-EXPOSURE). (N = 6) (3000 PPM).....	66
FIGURE 4. BLOOD ACETALDEHYDE CONCENTRATIONS FOR GROUPS $ALDH2^Q/2^Q$ (A) AND GROUPS $ALDH2^R/2^R$ (B) IN MALES (BLUE) AND FEMALES (RED) AT DIFFERENT TIME POINTS (2, 20 AND 40 MIN POST-EXPOSURE). (N = 6) (3000 PPM).....	67

LISTE DES TABLEAUX

1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES :

TABEAU 1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ETHANOL	4
---	---

TABEAU 2 :PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACETALDEHYDE.....	19
---	----

2. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE :

TABLE 1. CLASSIFICATION OF THE 48 RATS USED IN THE EXPERIMENT	54
---	----

TABLE 2. ETHANOL (EtOH) AND ACETALDEHYDE (ACTDH) CONCENTRATIONS FOR THE STANDARD CURVE	55
---	----

TABLE 3. MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF BLOOD ETHANOL CONCENTRATIONS MEASURED. (N = 6) (T = 2 MINS) (EXPOSURE = 1000 PPM)	56
--	----

TABLE 4. MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF BLOOD ACETALDEHYDE CONCENTRATIONS MEASURED. (N = 6) (T = 2 MINS) (EXPOSURE = 1000 PPM)	57
---	----

TABLE 5. MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF BLOOD ETHANOL CONCENTRATIONS MEASURED. (N = 6) (T = 2 MINS) (EXPOSURE = 3000 PPM)	58
--	----

TABLE 6. MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF BLOOD ACETALDEHYDE CONCENTRATIONS MEASURED. (N = 6) (T = 2 MINS) (EXPOSURE = 3000 PPM)	59
---	----

TABLE 7. BAL'S CELLULAR CONTENT IN MALES ALDH2 ^Q /2 ^Q . (RESULTS EXPRESSED IN PERCENT TOTAL WHITE CELL COUNT)	60
--	----

TABLE 8. BAL'S CELLULAR CONTENT IN FEMALES ALDH2 ^Q /2 ^Q . (RESULTS EXPRESSED IN PERCENT TOTAL WHITE CELL COUNT)	61
--	----

TABLE 9. BAL'S CELLULAR CONTENT IN MALES ALDH2 ^R /2 ^R . (RESULTS EXPRESSED IN PERCENT TOTAL WHITE CELL COUNT)	62
--	----

TABLE 10. BAL'S CELLULAR CONTENT IN FEMALES $ALDH2^R/2^R$. (RESULTS EXPRESSED IN PERCENT TOTAL WHITE CELL COUNT)	63
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ACTDH : Acétaldéhyde

ADH : Alcool déshydrogénase

CYP2E1 : Cytochrome p-450 2E1

E10 : Mélange contenant 10% d'éthanol et 90% d'essence

Eq : Équivalent

EtOH : Éthanol

FAEEs : Éthylesters d'acides gras

GES : Gaz à effet de serre

HDL : High density lipoprotein

IARC : International Agency for Research on Cancer

LDL : Low density lipoprotein

MEOS : Microsomal ethanol oxidizing system

Mt : Mégatonne

NIAAA : National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism

REL : Réticulum endoplasmique lisse

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le docteur Robert Tardif pour m'avoir donné l'opportunité et de travailler sur un projet de cette envergure. Sa grande compétence dans le domaine et son haut niveau de disponibilité auprès des étudiants m'ont permis de travailler avec confiance. Sa grande patience m'a permis de travailler dans un des conditions favorables à l'apprentissage.

Je remercie plus particulièrement Mme Mylène Beaudoin pour m'avoir guidé sur le plan méthodologique. Son intelligence et sa grande maturité m'ont permis de faire le travail expérimental en toute quiétude.

Des remerciements s'adressent également au docteur Michel Charbonneau et à Mme Guylaine Lassonde pour leur précieux travail au niveau des lavages bronchoalvéolaires et des coupes histologiques.

Je désire également remercier Mme Ginette Charest-Tardif pour son aide et ses conseils, et surtout pour son rôle de deuxième mère dans les heures de travail. Elle a grandement favorisé le travail dans un environnement serein et familial.

Enfin, j'aimerais remercier M. Philippe Nantel et Mme Geneviève Hamelin, qui ont fait preuve d'une grande disponibilité lorsque leur aide était nécessaire.

Je tiens à exprimer un remerciement très spécial à mes parents, qui m'ont toujours supporté et encouragé dans mes études. Leur amour inconditionnel est sans aucun doute la principale raison de mes accomplissements.

1. CHAPITRE PREMIER :
INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Considérations générales

1.1.1. Contexte et problématique

Les gaz à effet de serre (GES) sont depuis longtemps une source majeure de pollution atmosphérique. Au Canada, les émissions totales continuaient d'augmenter depuis plusieurs années, passant de 607 Mt (éq CO₂) en 1990 à 699 Mt en 1999. Le Canada, qui est engagé avec le protocole de Kyoto, devra émettre un maximum de 571 Mt GES par an pour la allant de 2008 à 2012. Le scénario habituel (si aucune mesure n'est prise) prévoit des émissions atteignant 809 Mt en 2010 (figure 1). Le gouvernement canadien doit donc prendre les mesures nécessaires pour réduire de 29 % les émissions qui seraient associées au scénario habituel de 2010. Le secteur principal pour les émissions de GES est celui du transport, avec 37 % des émissions totales au Québec et 27 % au Canada. Les GES provenant de la combustion d'essence incluent les composés d'oxyde nitrique (NOX), les matières particulaires (PM), les composés organiques volatiles (COV) et, en quantités beaucoup plus élevées, le CO et CO₂. En 1997, l'essence routière contribuait à 62,2 % des GES émis par le secteur du transport au Canada (Santé Canada, 2005).

1.1.2. Mesures prises pour tenter de régler la situation

Une solution possible envisagée par le gouvernement canadien pour atteindre ses objectifs de réduction de GES est le recours au mélange éthanol-essence pour les véhicules moteurs. L'essence E10 (mélange contenant 10% d'éthanol et 90% d'essence) réduirait les émissions de GES d'environ 5%. Ceci représente un avantage au niveau environnemental, mais l'exposition humaine involontaire par voie

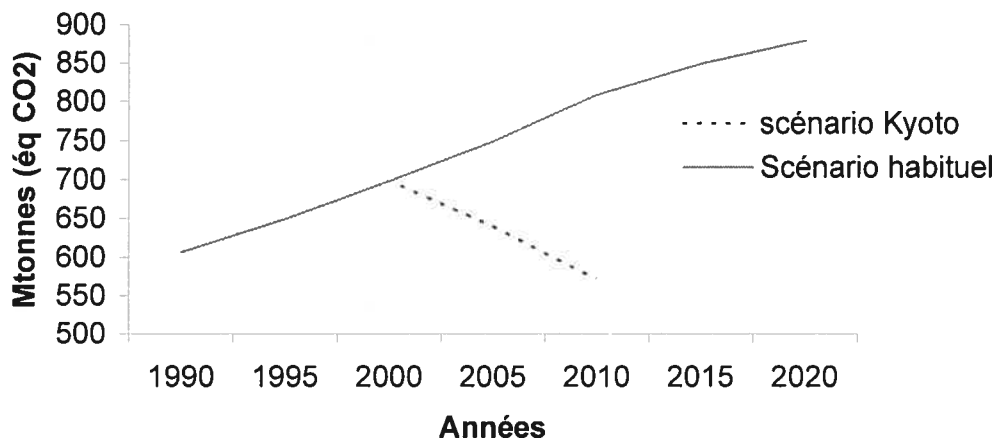


Figure 1. Projection des émissions de gaz à effet de serre (ligne pleine) comparé au scénario qui respecterait les objectifs établis par le protocole de Kyoto (ligne pointillée).

Adapté de : Toby Vigod (2002).

d'inhalation augmenterait suite à cette utilisation à grande échelle. Il est donc important de bien connaître ses effets potentiels, tout comme ceux de ses métabolites, en particulier pour des individus qui pourraient s'avérer susceptibles (ex, déficients en acétaldéhyde déshydrogénase de type 2 (ALDH2)) (Ressources naturelles Canada, 2005).

1.2. Données générales sur l'éthanol

1.2.1. Propriétés physico-chimiques

L'éthanol (EtOH) est un liquide souvent utilisé comme solvant organique en industrie.

Ses propriétés physico-chimiques sont présentées au tableau 1.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques de l'éthanol (THE MERCK INDEX, 1989; ACGIH, 2001)

Caractéristique	Information pour l'éthanol
Formule chimique	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
Synonyme	Alcool éthylique
Apparence	liquide transparent, incolore
Masse moléculaire	46.07
Densité	0.789 g/cm ³
Solubilité	Dans l'eau et solvants polaires
Pression de vapeur (20 °C)	43.89 mmHg
Point de fusion	-114,1 °C
Point d'ébullition	78,5 °C
Facteurs de conversion (25 °C)	1 ppm = 1.88 mg/m ³ (1mg/m ³ = 0.532 ppm)
% dans l'air saturée (25 °C)	6.58
Seuil de détection olfactive	84 ppm

1.2.2. Origine de l'éthanol

1.2.2.1. Sources

L'éthanol est produit à partir de la biomasse provenant principalement des plantes et de céréales, comme la canne de sucre, la mélasse, le blé, le maïs, le riz, etc. Cette biomasse inclut tout ce qui est considéré comme résidu d'agriculture, déchets forestiers, déchets solides des municipalités, déchets engendrés lors de la production de nourriture et déchets industriels organiques. Les composantes principales de ce type de biomasse sont, en ordre d'importance, la cellulose (40% - 60%), l'hémicellulose (20% - 40%) et les polymères complexes (lignine) (10% - 24%) (U.S. Department of energy, 2005). Pour que l'éthanol puisse être utilisé comme combustible d'automobile en le mélangeant à l'essence, il doit être pur à au moins 99.5 % v/v (Ressources naturelles Canada, 2005).

1.2.2.2. Production

1.2.2.2.1. Manipulation de la biomasse

Pour faciliter la production d'éthanol, la biomasse provenant de toute source doit être réduite en « morceaux » plus facilement manipulables.

1.2.2.2.2. Prétraitement de la biomasse

Par des réactions d'hydrolyse, l'hémicellulose contenue dans la biomasse est réduite en sucres simples à 5 ou 6 carbones. L'hydrolyse se produit par l'action d'acide sulfurique mis en contact avec la biomasse.

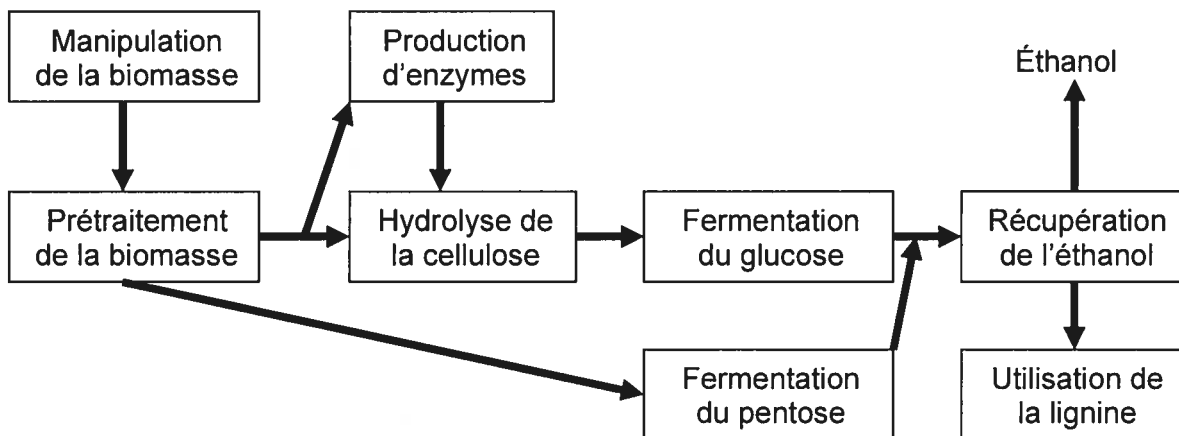


Figure 2. Diagramme illustrant les différentes étapes de production d'éthanol.

Adapté de: U.S. Department of energy (2005).

1.2.2.2.3. Production d'enzymes et hydrolyse de la cellulose

Cette étape consiste en la production (ou à l'achat) d'enzymes nécessaires (cellulases) pour hydrolyser la cellulose et ainsi briser les chaînes de sucre, pour donner du glucose.

1.2.2.2.4. Fermentation du glucose ou du pentose

Les bactéries et les levures vont consommer le glucose pour produire de l'éthanol et du CO_2 . Le xylose, pentose le plus fréquent résultant des réactions d'hydrolyse de l'hémicellulose, va fermenter en utilisant habituellement la *Zymomonas mobilis*.

1.2.2.2.5. Récupération de l'éthanol

Le produit de la fermentation de glucose et du pentose est appelé « bouillon » d'éthanol. Dans ce « bouillon », l'éthanol est séparé des autres constituants. L'étape finale consiste en la déshydratation de l'éthanol pour s'assurer qu'il ne reste plus pratiquement plus d'eau.

1.2.2.2.6. Utilisation de la lignine

La lignine qui est un produit dérivé de la biomasse peut être brûlée dans le but de produire l'énergie nécessaire à la production d'éthanol (U.S. Department of energy, 2005).

1.2.2.3. Utilisations

L'éthanol est le plus souvent utilisé dans la production de boissons alcoolisées et donc, l'exposition humaine la plus commune se fait par voie orale. Cependant, l'utilisation de plus en plus accrue du mélange éthanol-essence fera en sorte que l'inhalation impliquant une absorption pulmonaire pourrait s'avérer une voie d'exposition importante dans l'avenir.

1.2.3. Cinétique de l'éthanol dans l'organisme

1.2.3.1. Absorption de l'éthanol

Étant donné que l'éthanol est une petite molécule (< 600 Daltons), lorsque ingéré, il est absorbé dans l'estomac et l'intestin par diffusion passive en utilisant des pores membranaires aqueux (Benz et al, 1980). La grande partie de cette absorption se fait dans l'intestin grêle (70-80%) (Inserm, 2001). En général, plus l'ingestion de lipides augmente, plus la vidange gastrique ralentit, ce qui a pour effet de ralentir la vitesse d'absorption des aliments. Par contre, l'ingestion de lipides augmente la circulation sanguine mésentérique et étant donné que l'absorption d'éthanol se fait de façon passive et que c'est une molécule très hydrophile (donc circule bien dans le sang), une augmentation de l'ingestion de lipides va entraîner une augmentation de l'absorption d'éthanol (Jones et al., 1994) (Jones et al., 1997).

1.2.3.2. Distribution de l'éthanol

L'éthanol, qui a une demi-vie de distribution de 7-8 minutes une fois rendu dans la sang, se distribue surtout dans les organes très bien perfusés comme le foie, le cerveau et les poumons (Jones et al., 1990). Son caractère très hydrophile fait en sorte qu'il se distribue difficilement dans les os et les graisses; son cheminement dans l'organisme n'implique pas de liaison aux protéines plasmatiques. Son volume de distribution dans l'organisme se rapproche donc du volume d'eau corporel total, soit 41 litres chez un homme de 70 kg. Les différences observées entre hommes et femmes quant au volume de distribution de l'éthanol sont en grande partie dues à la différence entre la proportion de masse grasse et la proportion de masse maigre

entre les hommes et les femmes; ainsi, par exemple si on administre une dose d'éthanol à des hommes et des femmes en considérant leurs volumes d'eau respectifs au lieu de leurs masses corporelles, on obtiendrait des volumes de distribution identiques. Chez les hommes, le volume de distribution se rapproche de 0,6 litres/kg, tandis qu'il se rapproche de 0,5 litres/kg chez les femmes (Goist et al., 1985) (Jones et al., 1992).

1.2.3.3. Élimination de l'éthanol

1.2.3.3.1. Effet de premier passage

L'effet de premier passage représente la fraction d'une dose qui est métabolisée par le foie suite au passage, via la veine porte, d'une substance ayant été absorbée par le tube digestif. Dans le cas de l'éthanol, cet effet ne représente habituellement qu'une petite fraction de la clairance totale et est donc négligeable (Levitt, 1997). Dans certains cas où la vidange gastrique est ralentie, comme lorsque des aliments se retrouvent dans l'estomac, l'effet de premier passage peut s'avérer plus important. Ceci s'explique par le fait que le métabolisme de l'éthanol, qui a une cinétique d'ordre zéro, arrive à saturation enzymatique lorsque les concentrations sanguines d'éthanol dépassent un certain niveau. Donc, en ralentissant la vidange gastrique, la dose totale d'éthanol se retrouvant dans l'estomac serait absorbée plus lentement, ce qui diminuerait la concentration sanguine maximale (C_{\max}) d'éthanol et augmenterait le temps pour l'atteinte du C_{\max} (T_{\max}). Les enzymes de métabolisme de l'éthanol auraient moins tendance à être saturées, favorisant ainsi l'effet de premier passage.

1.2.3.3.2. Métabolisme oxydatif de l'éthanol

Une fois dans l'organisme, l'éthanol circule librement dans le sang. Il peut donc atteindre rapidement les organes impliqués dans son métabolisme, le plus important étant le foie; d'autres organes comme le cerveau, les reins, l'estomac, l'intestin, le pancréas, le poumon métabolisent également l'éthanol. Les hépatocytes ont trois façons de métaboliser l'éthanol : la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) dans le cytosol, le microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) utilisant le cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1) dans le réticulum endoplasmique lisse et la voie de la catalase dans les péroxisomes (figure 3). Ces trois voies métaboliques sont en fait des réactions d'oxydation et le convertissent en acétaldéhyde (ACTDH). Cette biotransformation a pour résultat de rendre l'éthanol plus hydrophile pour faciliter son élimination (Parkinson, 2001).

L'acétaldéhyde produit par ces réactions d'oxydation va ensuite entrer dans les mitochondries cellulaires pour y être biotransformé en acétate (ou acide acétique) par l'ALDH2 (Parkinson, 2001).

L'acétate produit par oxydation de l'ACTDH va sortir des hépatocytes pour entrer dans des tissus extra hépatiques, dans lesquels il sera converti en acétyl-CoA (Romero, 2004). L'acétyl-CoA va ensuite entrer dans le cycle du citrate (ou cycle de Krebs) pour être converti en CO_2 et en H_2O ce qui a pour effet de libérer de l'énergie sous forme de GTP et de $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Yamashita, 2001).

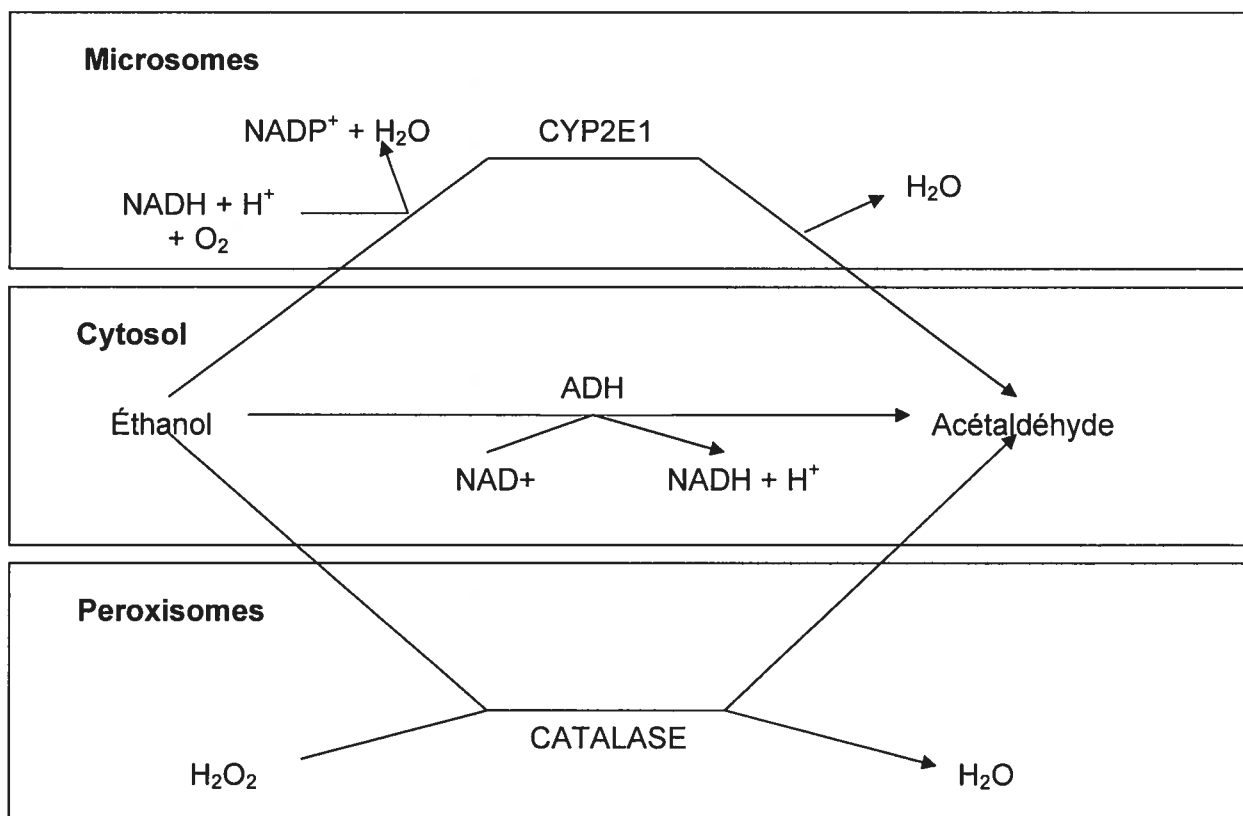


Figure 3. Principales voies métaboliques de l'éthanol.

D'après Parkinson, A. 2001. Biotransformation of Xenobiotics. Dans Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons, 6^e éd., p. 155

1.2.3.3.3. Métabolisme non oxydatif de l'éthanol

Il existe également une voie métabolique pour l'éthanol qui n'est pas oxydative. Quoique les mécanismes d'action de cette voie ne soient pas aussi bien connus que ceux des trois voies oxydatives, on sait que les produits finaux de cette réaction non oxydative sont des substances connues sous l'acronyme de FAEEs (Éthylesters d'acides gras) (Best, 2003). La voie non oxydative prédomine au niveau du pancréas, où se manifestent également les voies oxydatives (Chrostek, 2003).

Une inhibition des voies métaboliques oxydatives de l'éthanol donne des concentrations plus élevées de FAEEs, ce qui indique que les deux voies (oxydatives et non oxydatives) sont inter reliées métaboliquement de façon alternative (Chrostek, 2003).

1.2.3.4. Excrétion de l'éthanol

L'éthanol peut être éliminé sans subir de biotransformation, c'est-à-dire sous forme inchangée, par l'air expirée, l'urine et la sueur (Lands, 1998). Chez un homme de 70 kg, la clairance pulmonaire est estimée à 0,16 litres/h, la clairance rénale à 0,06 litres/h et la clairance cutanée à 0,02 litres/h (INSERM, 2001).

1.2.3.5. Facteurs influençant la cinétique de l'éthanol

1.2.3.5.1. La nourriture

La présence et le type de nourriture dans le tractus gastro-intestinal vont influencer l'absorption d'éthanol ingéré (Wallgren et al., 1970). Une diète riche en gras va diminuer la vidange gastrique, ce qui aura pour conséquence un ralentissement de l'absorption d'éthanol. Une étude a démontré que l'ingestion d'éthanol après un repas contenant le trois types de nutriments énergétiques, c'est-à-dire glucides, lipides et protéines, diminue d'un facteur de trois l'absorption d'éthanol comparativement à l'ingestion d'éthanol l'estomac vide (Jones et al, 1994).

1.2.3.5.2. Le genre

En général, les hommes présentent des concentrations sanguines plus basses que les femmes lorsque exposés aux mêmes doses (Lieber, 2000). Deux raisons pourraient expliquer ce phénomène : les femmes ont moins d'eau corporelle que les hommes, ce qui diminue volume de distribution chez les femmes (NIAAA, 1990); l'activité métabolique de l'ADH gastrique est plus faible chez les femmes (Seitz, 1993).

1.2.4. Effets de l'éthanol dans l'organisme

1.2.4.1. Poids corporel

Même si l'éthanol est une molécule ayant une valeur énergétique (7 kcal/g) qui se situe entre celle des glucides (4 kcal/g) et des lipides (9 kcal/g), des études ont montré que cet apport calorique n'était pas associé à un gain de poids. Bien au contraire, une étude réalisée par Gruchow et al. en 1985 indiquait que plus la dose ingérée d'éthanol augmentait chez les hommes, plus la perte de poids était importante. Une autre étude a démontré que ce phénomène s'observait aussi chez les femmes (Colditz et al, 1991).

1.2.4.2. Pulmonaires

L'inhalation d'éthanol facilite l'absorption d'autres substances, comme les protéines (Choi et al, 2001) et certains médicaments administrés par voie d'inhalation comme l'insuline (Heinemann et al, 2000). Ce phénomène est possible, car l'éthanol rend

plus perméable l'épithélium pulmonaire en influençant les jonctions serrées, la segmentation de la membrane plasmique, ou d'autres propriétés de barrières de la cellule, améliorant l'efficacité de l'entrée du médicament dans la circulation sanguine, tout en soulevant des questions concernant la sécurité à long terme (Edwards et al, 2003).

1.2.4.3. Cardiaques

Des doses modestes d'éthanol vont augmenter les concentrations sanguines de HDL (high density lipoprotein) et diminuer la pression artérielle, mais vont aussi augmenter les concentrations plasmatiques de triglycérides, diminuer la contractilité cardiaque et augmenter la fréquence cardiaque. De plus, il semblerait que l'éthanol bénéficierait aux personnes ayant des taux élevés de LDL (low density lipoprotein) (Hein, 1996). Chez les diabétiques, l'éthanol peut engendrer une athérosclérose et cette réponse est dose dépendante (Cooper, 2002). Tout comme l'aspirine, l'éthanol réduit les niveaux de thromboxane A₂, ce qui a pour effet de réduire la coagulation sanguine et donc de réduire les chances de formation de caillots sanguins. Par contre, cet effet augmente les dangers d'hémorragies (Mikhailidis, 1986).

1.2.4.4. Hépatiques

L'éthanol réduit l'efficacité des hépatocytes à oxyder les acides gras. Cette oxydation est nécessaire au foie, car elle constitue sa principale source énergétique. L'éthanol cause une augmentation du ration NADH/NAD^+ , ce qui diminue l'activité des enzymes responsables de la beta-oxydation. Si les niveaux de NAD^+ sont trop bas, il

Il y a diminution de l'activité du cycle du citrate et les hydrogènes équivalents provenant de l'éthanol vont donc être utilisés par ce cycle dans la mitochondrie au lieu d'être utilisés pour l'oxydation des acides gras. Cette diminution de l'oxydation des acides gras a aussi pour effet d'accumuler les acides gras dans le foie et possiblement causer une stéatose (foie gras) (Forsell, 1981). Une exposition chronique à l'éthanol par voie orale peut causer une hépatite alcoolique qui peut dégénérer en nécrose, en inflammation hépatique et en une augmentation de dépôt de collagène, ce qui risque de se transformer en cirrhose hépatique. Cette cirrhose qui peut être mortelle, pourrait être causée par une altération de la dégradation des fibres de collagènes (Lieber, 1991).

1.2.4.5. Neurologiques

La zone du cerveau la plus affectée par l'éthanol est l'hippocampe. Des études animales ont démontré que l'éthanol peut produire une neurodégénération nécrotique dans l'hippocampe (Obernier et al., 2002). Les FAEEs produits dans le cerveau à partir du métabolisme non oxydatifs de l'éthanol sont particulièrement dommageables pour l'hippocampe (Gubitosi-Klug et al., 1996). Chez les adultes, l'éthanol inhibe la neurogénèse dans l'hippocampe, mais de façon réversible (Herrera et al., 2003). De plus, une étude chez le rat a démontré que l'éthanol potentialise l'inhibition à médiation GABA et bloque la libération de glutamate dans l'hippocampe, ce qui a pour effet une réduction de l'apprentissage spatial et de la mémoire. Ces effets sont toutefois complètement réversibles 24h suivant l'arrêt de l'exposition (Silvers et al., 2003).

1.2.4.6. Cancérogènes

Aucune étude n'a démontré que l'éthanol seul est un cancérogène (génétoxique). Cependant, lorsque jumelé à certains cancérogènes connus, l'éthanol agit comme cancérogène de type épigénétique (Seitz et al., 1988). Les fumeurs consommant de grandes quantités d'éthanol sont plus à risques de développer un cancer de la bouche et du pharynx (Blot, 1992). En 1988, l'IARC a conclu qu'il y avait des évidences « suffisantes » que l'éthanol cause des tumeurs dans la cavité orale, le larynx, le pharynx, l'œsophage et le foie chez l'humain. De plus, les individus atteints du virus de l'hépatite B et qui boivent de façon excessive sont plus susceptibles d'être atteints d'un cancer hépatique (Ohnishi et al., 1982). Chez les femmes, les probabilités d'être atteintes du cancer du sein augmentent de 9% pour chaque 10 g d'éthanol ingéré quotidiennement jusqu'à 60 g (54%) (Fentiman, 2000) (Smith-Warner et al., 1998). Une revue de littérature ayant porté sur 53 études épidémiologiques sur le cancer du sein, regroupant 58 515 femmes atteintes du cancer et 95 067 femmes non atteintes, a conclu que pour chaque 10 g d'éthanol consommé, les femmes augmentent de 7.1% leur risque d'être atteintes de cancer du sein. Cette étude concluait aussi que 4% des cancers du sein dans les pays développés sont attribuables à la consommation d'éthanol (Cancer Research UK, 2002). Une étude de cohorte incluant 276 000 Américains a démontré un lien direct entre l'incidence du cancer et la consommation d'éthanol (Boffeta et al., 1990).

1.2.4.7. Reproducteurs

L'éthanol et ses métabolites (par exemple l'acétaldéhyde) peuvent altérer l'équilibre des hormones sexuelles tant chez les hommes que les femmes (Wright et al., 1991; Mello et al., 1993).

Chez les hommes, l'éthanol et ses métabolites peuvent produire des lésions testiculaires et diminuer la production de testostérone et de sperme (Johnston et al., 1981). Il est connu qu'une diminution de la production à long terme pourrait engendrer une féminisation de certains organes ou un hypogonadisme chez les hommes, comme une croissance des seins, une atrophie des testicules et de la prostate et une perte de libido (Bannister et al., 1987 ; Wright et al., 1991). Certains auteurs suggèrent que l'éthanol et ses métabolites ont non seulement des effets locaux au niveau testiculaire, mais aussi sur les parties du cerveau qui contrôle la production et la sécrétion des hormones sexuelles, c'est-à-dire l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (Wright et al., 1991 ; Emanuele et al., 2001). De plus, l'éthanol est un inhibiteur du métabolisme de la vitamine A, qui est nécessaire pour le développement du sperme (Leo et al., 1982).

Chez les femmes, l'éthanol et ses métabolites augmentent la production d'estradiol et diminuent son métabolisme, ce qui a pour effet une « double » augmentation des concentrations d'estradiol dans l'organisme (Mello et al. 1993).

1.2.4.8. Métaboliques

Comme mentionné plus haut, le CYP2E1 est l'un des enzymes qui métabolisent l'éthanol. Il a été démontré que l'éthanol induit efficacement le CYP2E1 dans le foie (Rowlands et al., 2003; Zerilli, 1995). Cette induction est possible tant lors d'expositions aiguës à fortes doses (Petersen et al., 1982) que lors d'expositions chroniques à faibles doses (Roberts et al., 1994). Deux mécanismes connus pourraient expliquer l'induction de CYP2E1 par l'éthanol :

1. Une augmentation de la stabilisation du CYP2E1. Cette stabilisation protéique s'expliquerait par une protection apportée par l'éthanol qui empêcherait l'enzyme de subir une dégradation cytosolique. La demi-vie du CYP2E1, qui est habituellement de 6-7 heures, serait de 38 heures en présence d'éthanol (Roberts et al., 1995).
2. Une augmentation de la transcription du gène du CYP2E1 (Badger et al., 1993).

Le CYP2E1 métabolise aussi plusieurs autres substances, dont certains composés de nombreux solvants comme le benzène, le styrène et le trichloroéthylène. Ainsi, une induction du CYP2E1 par l'éthanol va non seulement augmenter la vitesse de métabolisme de l'éthanol, mais aussi des autres substances métabolisées par cet enzyme. Ainsi une exposition répétée à l'éthanol (i.e., chronique) qui se traduit par des taux de CYP2E1 plus élevés (Manno et al., 1996) peut augmenter la toxicité de certains solvants, comme le chloroforme (Kutob et Plaa, 1962), le trichloroéthane (Klaassen et Plaa, 1966), le trichloroéthylène (Cornish et Adefuin, 1966). En revanche lorsque présent dans l'organisme, l'éthanol peut agir comme agent protecteur en raison de son action d'inhibiteur compétitif du métabolisme (CYP2E1)

de ces mêmes solvants (Lieber, 1997). Par exemple, une étude de Folland et al. (1976) a démontré chez des travailleurs qu'une exposition par inhalation à du CCl_4 suite à l'inhalation d'alcool a produit une toxicité hépato-rénale et ce, à des concentrations d'alcool qui ne sont normalement pas toxiques chez l'humain.

1.3. Données générales sur l'acétaldéhyde

1.3.1. Propriétés physico-chimiques

En tant que liquide, l'acétaldéhyde est plus léger que l'air et en tant que vapeurs, plus lourd que l'air (Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques de l'acétaldéhyde (THE MERCK INDEX, 1989; ACGIH, 2001)

Caractéristique	Information pour l'acétaldéhyde
Formule chimique	CH_3CHO
Synonyme	aldéhyde acétique, éthyl aldéhyde, éthanal
Apparence	liquide transparent, incolore
Masse moléculaire	44.05 g/mol
Densité	0.788 g/cm ³
Solubilité	Dans l'eau et solvants polaires
Pression de vapeur (20 °C)	740 mmHg
Point de fusion	-123,5 °C
Point d'ébullition	21,0 °C
Facteurs de conversion (25 °C)	1 ppm = 1.83 mg/m ³ (1mg/m ³ = 0.55 ppm)
Seuil de détection olfactive	0.21 ppm

1.3.2. Origine de l'acétaldéhyde

1.3.2.1. Sources

L'acétaldéhyde est présent dans l'organisme humain en tant qu'intermédiaire métabolique, par exemple, en tant qu'intermédiaire métabolique de l'éthanol. L'acétaldéhyde peut également être produit de façon endogène, plus précisément suite au catabolisme du désoxyribose phosphate et de certains acides aminés (Nicholls, 1992). On retrouve aussi cette substance dans certains breuvages, surtout de nature alcoolisée, et dans la fumée de cigarette. L'acétaldéhyde est également présent dans les conduits d'échappements des automobiles en tant que produit de combustion de l'essence, surtout lorsque celle-ci est mélangée à l'éthanol. De plus, l'ACTDH est retrouvé dans les déchets de plusieurs types d'industries, par exemple lors de la dégradation d'hydrocarbures et de composée biologiques solides (EHC, 1995).

1.3.2.2. Utilisations

L'ACTDH est surtout utilisé en tant qu'intermédiaire pour la production d'acétate principalement, d'esters et de nombreux autres produits chimiques comme la pyridine et l'acide peracétique. En plus de ce rôle d'intermédiaire de synthèse, l'ACTDH est aussi utilisé pour argenter les miroirs, durcir les fibres de gélatine et dénaturer l'alcool. Enfin, l'ACTDH sert notamment à la production de désinfectants, de teintures, de drogues, d'explosifs et de vernies (U.S. EPA, 1994).

1.3.3. Cinétique de l'acétaldéhyde dans l'organisme

1.3.3.1. Absorption

Aucune donnée n'existe concernant les mécanismes d'absorption de l'ACTDH, mais plusieurs études visant à étudier les effets des différentes voies d'absorption de l'ACTDH donnent des indices que l'ACTDH est rapidement absorbé par la voie orale et respiratoire et qu'une absorption cutanée est également possible (ACGIH, 2001).

1.3.3.2. Distribution

L'ACTDH est une molécule qui se distribue à travers tout l'organisme. En effet, dans une étude chez les rats exposés à 20mM de vapeurs d'acétaldéhyde pendant une heure, l'ACTDH a été retrouvée dans plusieurs tissus et organes de l'organisme, tels le foie, le sang, la rate, les reins et le cœur (HSDB, 1994). De plus, une étude effectuée par Blakley (1984) a démontré que l'ACTDH peut traverser la barrière placentaire, mais pas de façon très efficace, car les concentrations retrouvées dans le fœtus étaient très faibles. Une étude chez les humains exposés à l'éthanol a démontré que l'ACTDH peut entrer dans le cerveau, pour se retrouver dans le liquide interstitiel du cerveau et dans la région du thalamus-hypothalamus. Les concentrations d'ACTDH étaient 6 fois plus importantes lorsque les sujets étaient d'abord exposés au disulfiram, un inhibiteur de l'ALDH2 (Westcott et al., 1980). Suite à l'ingestion d'éthanol chez l'humain, l'ACTDH non métabolisé par les hépatocytes va se retrouver dans les globules rouges à des concentrations 10 fois plus importantes que celles retrouvées dans le plasma (Baraona, 1987).

1.3.3.3. Élimination

1.3.3.3.1. Effet de premier passage

Chez les personnes normales, la capacité métabolique vis-à-vis l'ACTDH est très grande de telle sorte qu'aux concentrations d'exposition normales cette voie métabolique est peu susceptible d'être saturée. La demi-vie sanguine de l'ACTDH varie de 3.1 minutes selon HSDB (1994) à moins de 15 minutes selon l'ACGIH (2001). L'effet de premier passage joue donc un rôle important dans la biodisponibilité de l'ACTDH, le foie métabolisant une portion non négligeable de la molécule.

1.3.3.3.2. Métabolisme de l'acétaldéhyde

Le métabolisme de l'ACTDH se produit surtout dans les mitochondries des hépatocytes, où l'ACTDH est métabolisé en acétate majoritairement par l'ALDH2 NAD⁺-dépendant lors d'une réaction d'oxydation. L'ACTDH peut aussi être oxydé par d'autres enzymes, comme la catalase et autres oxydases, mais ces autres voies métaboliques ne représentent que 10% du métabolisme de l'ACTDH (Brien, 1983). On retrouve aussi une activité de l'ALDH2 dans les tubules rénaux et dans l'épithélium pulmonaire, mais la voie hépatique demeure la principale voie métabolique de l'ACTDH (IARC, 1988; EHC, 1995; ACGIH, 2001).

1.3.3.4. Excrétion

Presque tout l'ACTDH absorbé dans l'organisme sera excrété après avoir été biotransformé suite à différents processus métaboliques. Seulement 5% environ de la molécule mère sera excrétés et ce, par la voie pulmonaire. Aucune excrétion urinaire n'a été observée (Booze, 1986; ACGIH, 2001).

1.3.4. Effets de l'acétaldéhyde dans l'organisme

1.3.4.1. Doses intraveineuses

Chez l'humain, des doses intraveineuses de 20.6 – 82.4 mg/min d'ACTDH causent une augmentation des palpitations cardiaques, de la fréquence respiratoire et de l'espace mort respiratoire, en plus de diminuer les concentrations alvéolaires de CO₂ (IARC, 1988). Lorsque les concentrations sanguines d'ACTDH deviennent trop élevées, il y a stimulation de nerf vague, ce qui pourrait causer une inhibition de la respiration jusqu'à la mort (Lamboeuf, 1987).

1.3.4.2. DL50 et CL50

Chez le rat, la DL50 calculée pour la voie orale est de 1.93 g/kg, tandis que la CL50 est de 20 000 ppm lors d'une exposition de 30 minutes (ACGIH, 2001).

1.3.4.3. Irritants/pulmonaires

Chez les humains les plus susceptibles, une exposition à des vapeurs d'ACTDH de 15 minutes à 25 ppm cause une irritation des yeux, alors que chez les personnes normales, l'irritation des yeux survient lors d'une exposition à 50 ppm pour la même durée. Une exposition à 134 ppm pendant 30 minutes cause une irritation du tractus respiratoire. Une exposition à 200 ppm pendant 15 minutes cause une irritation du nez et de la gorge (Verscheren, 1983). Une étude subchronique chez le rat exposé à 243 ppm d'ACTDH 8 heures/jour et 5 jours/semaine a révélé une hyperplasie de l'épithélium olfactif, une inflammation du nez et des lésions au niveau distal des voies pulmonaires, plus précisément une augmentation du volume résiduel et de la capacité résiduelle fonctionnelle (Saldiva, 1985). Une étude de 13 semaines chez le hamster exposé 6 heures/jour, 5 jours/semaine à 4560 ppm a démontré une augmentation du poids du cœur et des poumons, un retard de croissance, des lésions dégénératives de l'épithélium au niveau du larynx, de la trachée et des poumons, et des glandes subépithéliales. Une bronchopneumonie focale a aussi été observée (Kruysse, 1975).

1.3.4.4. Irritants/cutanés

Chez l'humain, un contact cutané prolongé à l'ACTDH peut causer de l'érythème et des brûlures, tandis que des contacts répétés avec la peau risque de causer une dermatose résultant de l'irritation et de la sensibilisation (IARC, 1988)

1.3.4.5. Gastro-intestinaux

Une étude chez les rats qui ingéraient des doses de 25, 125 ou 675 mg/kg/jour pendant 4 semaines a démontré des effets de hyperkératose de l'estomac, une légère réduction des reins chez les mâles et une diminution de la production d'urine pour la dose la plus forte seulement (Til et al, 1988). Chez des rats ingérant en moyenne 40 mg/kg/jour d'ACTDH contenu dans de l'eau à une concentration de 0,05%, une augmentation de synthèse de collagène a été observée dans le foie (Bankowski, 1993). Dans une étude subchronique chez le rat exposé à 500 mg/kg/jour d'ACTDH dans l'eau, des effets histopathologiques hépatiques ont été observés, tels une dégénérescence graisseuse microvésiculaire, une accumulation de gras et la présence de foyers de globules blancs (Matysiak-Budnik, 1996).

1.3.4.6. Neurologiques

Aucune donnée concluante n'existe sur la neurotoxicité chez l'humain causée par une exposition directe à l'ACTDH, mais des études indiquent que l'ACTDH pénètre dans le cerveau (HSDB, 1994). Chez l'animal par contre, une exposition à des concentrations se rapprochant de la CL50 a démontré une excitation accrue chez le rat (ACGIH, 2001). Chez les chiens exposés pendant 30 minutes à des concentrations dépassant 134 ppm d'ACTDH, une inhibition du système nerveux central a été observé, suivi d'une diminution du débit respiratoire. De plus, une simple dose intrapéritonéale de 5 mg/kg d'ACTDH chez le rat a produit une neurodégénérescence du cortex cérébral (Phillips, 1987). Des effets biochimiques

ont aussi été observés lors de cultures de neurones cortico-cérébrales *in vitro* (Kuriyama, 1987).

1.3.4.7. Génétiques/mutagènes

Avec des études *in vitro* utilisant la souche bactérienne *E. coli*, l'ACTDH s'est avéré positif au niveau de la réparation de l'ADN et au niveau de l'échange de chromatides sœurs chez les hépatocytes humains (U.S. EPA, 1994). Une étude *in vivo* a également démontré un échange de chromatides sœurs dans les cellules de la moelle osseuse et une augmentation de micronoyaux dans les globules rouges chez la souris exposée à l'ACTDH par exposition intrapéritonéale (Obe, 1979). Les informations concernant les effets mutagènes de l'ACTDH *in vitro* chez l'*E. coli* sont toutefois contradictoires. En effet, selon l'U.S. EPA (1994), l'ACTDH n'est pas mutagène ni chez la *Salmonella* ni chez le *E. coli* (ne mentionne aucune étude), tandis que des études de Veghelyi (1978) et de Igali (1980) ont montré des différences significatives entre exposés et témoins. En 1989, Crebelli démontra que l'ACTDH provoquait une mauvaise ségrégation chromosomique en plus de cross-over mitotique dans une étude *in vitro* sur l'*Aspergillus nidulans*. De plus, l'ACTDH forme un produit stable lorsque lié à l'ADN (et aux protéines) et peut donc réduire l'extractibilité de l'ADN. C'est ce qui a été observé dans l'épithélium olfactif nasal chez le rat exposé 6 heures/jour pendant 5 jours à 1000 ppm d'ACTDH (Lam, 1986).

1.3.4.8. Reproducteurs

Chez l'humain, aucune donnée n'est disponible concernant la toxicité sur la fonction reproductive. Chez la souris, des injections intraveineuses répétées causent une résorption embryonnaire (IARC, 1985). Chez le rat, des injections intrapéritonéales de 50 mg/kg/jour durant les jours 8 à 15 de la période de gestation chez la femelle ont provoqué un délai au niveau de l'ossification et des malformations squelettiques (HSDB, 1994). Une autre étude chez les femelles ayant ingéré 50, 75, 100 ou 150 mg/kg/jour d'ACTDH a démontré des effets tératogènes, comme une hémorragie faciale, en plus d'une résorption fœtale et d'une augmentation de la mortalité fœtale (Padmanabhan, 1983). Dans une étude subchronique chez le hamster exposé par inhalation à 1340 ppm, l'ACTDH a causé une diminution du poids des testicules et des ovaires (Kruysse, 1975).

1.3.4.9. Immunologiques

Peu de données ont été générées concernant l'immunotoxicité de l'ACTDH. Une étude chez la souris exposée par inhalation à 180 ppm d'ACTDH 3 heures/jour pendant 5 jours a démontré une réduction de 15% de l'activité des macrophages alvéolaires (Aranyi, 1986). Une étude *in vitro* a démontré une incapacité des monocytes à libérer du lysozyme pour une concentrations d'ACTDH de 0,03% (Schopf, 1985).

1.3.4.10. Cancérogènes

L'U.S. EPA (1994) place l'ACTDH dans la classe B2 des substances cancérogènes, qui est le groupe des cancérogènes probables chez l'humain. Une des seules études épidémiologiques disponibles chez l'humain a été réalisée auprès de travailleurs d'une usine travaillant principalement sur la dimérisation de l'ACTDH et a démontré une augmentation de l'incidence du cancer d'un facteur de 5 chez les travailleurs lorsque comparé à l'incidence au niveau de la population générale (Bittersohl, 1974). L' U.S. EPA ne l'a cependant pas considérée dans sa classification de l'ACTDH en tant que cancérogène à cause des nombreuses limites de cette étude, par exemple la petite taille de l'échantillon, la courte durée de l'étude, des biais dans la sélection des sujets et surtout, le fait que tous les cas de cancers étaient des fumeurs et que certains d'entre eux étaient également exposés à d'autres substances. Une grande étude sur le rat exposé à l'ACTDH par voie d'inhalation à des concentrations de 0, 750, 1500 ou 3000/1000 ppm d'ACTDH 6 heures/jour et 5 jours/semaine pendant 28 mois (55 rats par genre par dose) a été effectuée par Woutersen en 1986. À noter qu'un taux de mortalité trop élevé et trop tôt à 3000 ppm a forcé le chercheur à diminuer cette dose à 1000 ppm au cours de l'étude. Pour chaque dose d'exposition, des retards de croissance et des adénocarcinomes principalement au niveau de l'épithélium olfactif ont été observés, tandis que la réponse à des tumeurs au niveau du tractus respiratoire a augmenté en fonction de la dose. Certains rats mâles et femelles ont été soumis à une période de récupération de 26 ou 52 semaines. Au cours de cette période, une augmentation significative du nombre de tumeurs nasales a été observée, entre autre des adénocarcinomes et des carcinomes au niveau de la peau, chez les deux sexes. Lors d'une étude chez le

hamster exposé initialement à 2500 ppm d'ACTDH 7 heures/jour et 5 jours/semaine pendant un an avec 29 semaines de récupération suivant l'exposition, le chercheur a également dû diminuer la dose d'exposition à 1650 ppm en cours d'expérience à cause d'un important retard de croissance observé. Les principaux effets observés furent des lésions au niveau des fosses nasales (non néoplasiques), du larynx et de la trachée. Chez les animaux ayant survécu durant les 52 semaines d'exposition, aucune tumeur n'a été observée, tandis que chez ceux qui sont morts avant la fin de l'expérience, une augmentation de la fréquence d'apparition de tumeurs laryngiques a été observée (Feron, 1982).

CHAPITRE DEUXIÈME :
OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

2.1. Objectifs

2.1.1. Objectif général

Le but principal de ce travail était de mieux documenter les effets pulmonaires d'une exposition par inhalation à l'éthanol tant chez les animaux normaux que chez ceux plus susceptibles, c'est-à-dire déficients en ALDH2.

2.1.2. Objectifs spécifiques

À l'aide d'une étude animale :

- 1) De déterminer s'il existe un effet du dimorphisme sexuel sur la cinétique sanguine de l'éthanol et de l'acétaldéhyde;
- 2) D'étudier l'impact de la déficience en ALDH2 sur la cinétique sanguine d'éthanol et d'acétaldéhyde;
- 3) D'évaluer l'impact du dimorphisme et de la déficience sur les effets pulmonaires,

2.2. Démarche expérimentale

La démarche expérimentale détaillée est présentée dans le chapitre suivant. Le texte qui suit est donc un bref résumé du protocole expérimental.

2.2.1. Développement des colonies

La première étape de cette étude consistait à préparer deux colonies de rats Sprague-Dawley, mâles et femelles, une dont le génotype correspond à une activité rapide pour l'ALDH2^Q/2^Q (normale) et l'autre dont le génotype correspond à une activité nulle pour l'ALDH2^R/2^R (déficient) . Pour produire ces deux colonies de rats, deux groupes de 25 rats (un pour chaque genre) ont été utilisés au départ. Le sang de chacun des rats fut analysé par la technique de PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) pour déterminer le génotype de chaque rat pour le gène de l'ALDH2. Ensuite, les rats homozygotes ayant le même génotype ont été accouplés pour produire des rats correspondant au même génotype. Au total, 48 rats ont été utilisés, dont 24 étaient ALDH2^Q/2^Q et 24 ALDH2^R/2^R. Douze des 24 rats formant les sous-groupes étaient des mâles ou des femelles.

2.3.2. Scénario d'exposition

En séparant également mâles, femelles, Q/Q et R/R, 24 rats ont été gardés comme des témoins (non exposés) alors que 24 rats ont été exposés 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 13 semaines à 1000 ppm ou 3000 ppm d'éthanol dans une chambre d'inhalation.

2.3.3. Détermination des concentrations d'éthanol et d'acétaldéhyde

Des prises de sang ont été effectuées la première journée d'exposition des semaines 1, 4, 6, 8, 10 et 13 à trois temps suivants les 6 heures d'exposition: 2, 20 et 40

minutes. Les échantillons ont été conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse de ces échantillons de sang. La mesure de la concentration d'éthanol et d'ACTDH a été faite en utilisant une méthode par chromatographie en phase gazeuse.

2.3.4. Préparation des courbes d'étalonnage

Les concentrations d'éthanol et d'acétaldéhyde ont été mesurées à partir de courbes d'étalonnage préparées à partir de sang de rats Sprague-Dawley anesthésiés/sacrifiés au CO₂. Une fois le sang recueilli, les courbes ont été faites à partir d'acétaldéhyde 99,5 % et d'éthanol 100 %. Un total de 5 standards de concentrations différentes a été préparé pour chaque substance analysée.

2.3.5. Évaluation de la toxicité pulmonaire

À la fin des 13 semaines d'exposition, des lavages bronchoalvéolaires ainsi que des coupes histologiques sur les tissus (poumons et trachées) prélevés ont été effectués dans le but de déterminer si l'exposition sous chronique avait causé de la toxicité au niveau pulmonaire spécifiquement.

CHAPITRE TROISIÈME:
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Article submitted to Journal: Inhalation Toxicology

**Influence of Sexual Dimorphism and Genetic Polymorphism of ALDH2 on
Ethanol Kinetics, and Pulmonary Effects in the Sprague-Dawley Rat Exposed to
Ethanol Vapors**

Andrea Scarino¹, Michel Charbonneau² and Robert Tardif¹.

¹Département de santé environnementale et santé au travail.

Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Institut Armand-Frappier (INRS), Montréal, Québec, Canada.

Shortened title : PULMONARY EFFECTS OF INHALED ETHANOL IN THE RAT

Please address correspondence to:

Robert Tardif, Ph. D.
Département de santé environnementale et santé au travail
Université de Montréal
2375, Chemin de la Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec
Canada
H3T 1A8
Tel.: (514) 343-6111 ext. 1515
Fax: (514) 343-2200
[REDACTED]

ABSTRACT

In order to minimize emission of greenhouse gases, the use of ethanol in gasoline mixtures has seen tremendous growth in recent years. By way of inhalation, ethanol's effects are still unknown in individuals whose organisms do not metabolize ethanol properly. Our study seeks to verify the impact of sexual dimorphism and of genetic polymorphism of ALDH2 on the Sprague-Dawley rat subsequent to sub-chronic exposure (13 weeks) to ethanol vapour at 1000 or 3000 ppm, 6h/d, 5d/week. The results obtained indicate that males metabolize ethanol more efficiently than females; for example, following a 6 hour exposure to 1000 ppm of ethanol, the mean blood ethanol concentration for ALDH2^Q/2^Q (fast ALDH2 activity) males, 2 minutes following exposure in day 1, was significantly lower ($66.76 \pm 10.74 \mu\text{M}$) when compared with females ($87.6 \pm 15.3 \mu\text{M}$). There is no discrepancy in metabolism of acetaldehyde neither between genders nor between groups with different ALDH2 activity. There was no observed difference in blood ethanol concentrations between the two lineages considered. Subchronic exposure tends to decrease blood ethanol concentration with time; for example, in ALDH2^Q/2^Q males, blood ethanol concentration, 2 minutes following exposure in day 1, was $66.76 \pm 10.74 \mu\text{M}$, while for the same group in day 85, the blood ethanol concentration was $39.88 \pm 7.83 \mu\text{M}$ (exposure at 1000 ppm). Pulmonary toxicity was assessed using bronchoalveolar lavages and histological analyses of the lungs. Both these tests showed no significant differences between any groups. Results of this study allowed us to conclude that 3000 ppm represents a NOAEL for pulmonary toxicity in the Sprague-Dawley rat.

INTRODUCTION

To this day, most studies aiming to determine the toxic effects of ethanol on the organism have been performed through oral administration (ex: Lieber CS). However, this route does not constitute this product's only entryway. In fact, due to its volatility, ethanol can enter the organism through inhalation, as testifies that fact that some fuels have ethanol content varying usually between five and ten percent. This addition of ethanol in fuel seeks to reduce greenhouse gas emissions, such as carbon monoxide, yet concurrently increases concentration of ethanol in the air. Unintentional human exposure to this product is consequently unavoidable and likely to increase in the future. Furthermore, emission of acetaldehyde, a molecule also produced during the metabolism of ethanol in the organism, increases upon such usage of ethanol (Health Canada, 2005).

In the literature, very few works refer to the effects of inhaled ethanol, yet this issue is of critical importance, especially in view of the unintentional exposure found in the process described above. It has been suggested that the atmospheric concentration of ethanol generated by this usage is too low to induce toxicity in general population (Pastino et al., 1997), but the effects in individuals with an inability to metabolize ethanol and its by-products normally are uncertain. Indeed, it is known that ALDH2 (acetaldehyde dehydrogenase of type 2), an enzyme found in cells' mitochondria, metabolizes acetaldehyde in order to produce acetic acid (Parkinson, 2001). Although mostly present in the liver, this enzyme is also found in the lungs (Oyama et al., 2005). This metabolic activity varies between individuals according to several covariates, ethnicity being an example of such a covariate (Luo & Zhang, 2004).

The acetaldehyde found in the organism is produced upon metabolism of ethanol through three distinct pathways, namely through dehydrogenase alcohol (ADH), catalase and cytochrome P-450 2E1 (Parkinson, 2001). Despite that these three enzymes are mainly found in the liver, their presence has also been recorded in the lungs (McElroy et al., 1992; Yang et al., 2002). It is known that individuals who are $ALDH2^Q/2^Q$ homozygotes display heightened metabolic activity for this enzyme, that $ALDH2^R/2^R$ homozygotes display no activity at all and that heterozygotes display average metabolic activity. Although several studies demonstrate an accumulation of acetaldehyde in the blood of individuals deficient in ALDH2 (particularly Asians) upon ethanol consumption (Luo & Zhang, 2004), no indication as per the effect of inhaled ethanol in these individuals is given. Further, recent studies have noted the existence of significant differences across genders with respect to the kinetics of ethanol not yet metabolized by the organism in the short run in rats (Tardif & Charbonneau, 2001). However, this difference has not been investigated at sub-chronic or chronic levels.

The established goals for this study are therefore to determine whether there exists a sexual dimorphism with respect to the blood kinetics of ethanol and acetaldehyde following inhalation of ethanol vapors, to study the impact of ALDH2 deficiency on the kinetics of ethanol and acetaldehyde in the blood and to evaluate the potential impact of the dimorphism and deficiency on the pulmonary effects in Sprague-Dawley rats following sub-chronic (13 weeks) exposure to ethanol at 1000 and 3000 ppm.

MATERIALS AND METHODS

Rat colonies development

Two colonies of Spague-Dawley rats, one with an accelerated activity for acetaldehyde dehydrogenase ($ALDH2^Q/2^Q$) and the other, with a null activity for the same enzyme ($ALDH2^R/2^R$), were breaded. To develop both colonies, 25 males and 25 females were used. Blood samples from each rat were analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction) to determine their genotype for ALDH2. Homozygote rats having the same genotype were then breaded for a total of 48 rats, equally distributed into groups depending on their gender, genotype and level of exposure (Table 1).

Exposure concentration

Of the 48 rats, half were assigned to the control group whereas the other half were exposed to 1000 ppm of ethanol, 6 hours / day, 5 days / week, for a period of 13 weeks. The same experiment was reproduced a few months later with a concentration of 3000 ppm of ethanol using the same experimental conditions.

Determination of ethanol (EtOH) and acetaldehyde (Actdh) concentrations

Blood samples were taken on the Monday of weeks 1, 4, 6, 8, 10 and 13 at three different times: 2 minutes, 20 minutes and 40 minutes following the 6 hour exposure. The samples were kept at -80 °C until analyses a few days later. EtOH and ACTDH were measured by gas chromatography. The gas chromatograph used was the Varian Compak CP-3800 with a Combi-Pal automatic injector from CTC analytics. The column used was the Rtx-BAC1 30 m x 0.53 mm ID x 3 µm of film thickness.

Gasses used were ultra-zero air (60 psi) and ultra-pure hydrogen for the flame ionization detector (FID), ultra-pure helium (80 psi) as the vector gas and ultra-pure nitrogen as make-up gas. Helium in the column had a flow of 10.6 ml/min, nitrogen had a flow of 30 ml/min, ultra-zero air had a flow of 300 ml/min and hydrogen had a flow of 30 ml/min. The injector's temperature was set at 150 °C and the column's temperature started at 40 °C, stayed at that temperature for 2.25 minutes and then took a minute to increase to 60 °C and stayed at that temperature for 0.25 minutes for a total of 3.5 minutes. Retention times for ETOH and ACTDH were 1.57 minutes and 1.78 minutes, respectively. The FID detector's temperature was 250 °C.

Standard curve

Blood was obtained from rats sacrificed using CO₂. A total of five standards were then prepared using fresh blood, 99.5 % acetaldehyde and 100 % ethanol (Table 2). The ETOH and ACTDH concentrations were determined using the software Star workstation 5.3.

Evaluation of pulmonary toxicity

Isoflurane was used to anaesthetize the Sprague-Dawley rat. The animal's abdomen was then opened, and an opening was made in the trachea once it had been cleared. Via a puncture in the descending abdominal artery, the animal was then exsanguinated. An instillation tube connected to a cut 16G needle was inserted in the trachea, fixed in place by a thread. An opening in the peritoneum was then performed. Saline at room temperature (5 ml for males and 4ml for females) was injected in the animal's lungs and then removed. This procedure was repeated four times. The five BAL were then gathered in a same tube and kept on ice. After

centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes, the supernatant was removed by aspiration. The pellet was resuspended with approximately 500 μ l of saline (exact volume noted).

The lungs and the trachea were fixed *in situ* by infusing buffered formalin via an instillation tube; the abdominal artery was cut to allow the liquid to flow. The lungs were cleared and the trachea closed using a thread placed just downstream of the tube. The lungs, along with the heart and the trachea, were placed in a jar containing buffered formalin and kept 24h at room temperature before being transferred in a PBS solution at 4°C. The tissues were then coated in paraffin and histological cuts were made and put on laminas, coloured with eosin-hematoxylin. A certified pathologist veterinarian then did a qualitative histopathologic analysis of the tissues by photonic microscopy.

An aliquot (30 μ l) of the solution extracted from the BAL was added to 30 μ l of buffered formalin and that suspension (cells) was used for the cell count. A 1:1 mixture of the cells' suspension and of methylene blue was then put on a hemacytometer and the nucleic cells were counted.

A second aliquot was used to quantify the percentage of lymphocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils and cilia cells using Cytospin technique. A lamina was put on the Cytospin device (Cyto-Tek Filter Paper, no cat. 4333, Somagen). 100 μ l of PBS solution was then put in the sample compartment to dampen the filter paper and was centrifuged at 600 rpm for 2 mins. 150 μ l of PBS solution was added to the

sample, which was then placed in the sample compartment and centrifuged at 600 rpm for 2 mins. After air dried, the laminas were fixed 1 min with the fixer (Fisher Diagnostics no cat. 122-911A), and then coloured with solution I of Hema 3 (Fisher Diagnostics no cat. 122-911B) for 30 secs and with solution II of Hema 3 (Fisher Diagnostics no cat. 122-911C) for 30 secs. The lamina was rinsed with distilled water, air dried and then topped with a lamellae and Permount mounting medium (Fisher no cat. SP15-100). The cells were identified using a photonic microscope with an enlargement of 400X. A minimum of 300 cells per sample were counted and then listed in different categories: macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and cilia cells.

Ethanol and acetaldehyde kinetics in blood

Both a t-test and an ANOVA test have been performed in order to assess the significance (or lack of significance) of the discrepancies in the observed concentrations and further, to determine whether gender, time and polymorphism bear an impact on observed concentrations. All tests were performed on blood concentration averages recorded two minutes upon withdrawal from exposure chambers exclusively (Tables 3-6).

RESULTS

Blood EtOH concentrations for exposure at 1000 ppm (Table 3) (Figure. 1)

Influence of gender

In the ALDH2^Q/2^Q, the ethanol blood concentrations differences between males and females were significant ($p < 0.05$) for days 1, 50 and 85. In the ALDH2^R/2^R, the differences were significantly different for days 36, 50 and 64.

Influence of exposure duration (repeated exposure)

Repeated exposure caused a decrease in blood ethanol concentration. For instance, in the ALDH2^Q/2^Q males, the differences in ethanol blood concentrations with respect to day 1 become significantly lower from day 50 and on. The same differences were observed in the ALDH2^Q/2^Q females. As for the ALDH2^R/2^R groups, males showed significant differences in time with blood ethanol concentrations being significantly lower than day 1 from day 36 and on. Significant differences for females started at day 64. Taking into account each day considered, our test yielded significant results ($p < 0.0001$) for each group.

Influence of ALDH2 polymorphism

In considering distinct polymorphisms, statistical tests performed on subgroups of our data obtained by fixing gender and time factors yielded no significant difference whatsoever.

Blood ACTDH concentrations for exposure at 1000 ppm (Table 4) (Figure 2)

With respect to acetaldehyde, no significant difference was observed for both sexual dimorphism and time. Days 1 and 64 did however demonstrate significant differences for polymorphism in males, although significant differences for polymorphism in females were only observed on day 64 (Table 4).

Blood EtOH concentrations for exposure at 3000 ppm (Table 5) (Figure. 3)

Influence of gender

In the $ALDH2^Q/2^Q$, the ethanol blood concentrations differences between males and females for ethanol blood concentrations were significant for every day analyzed except for day 1 and day 85. In the $ALDH2^R/2^R$, every day analyzed showed significant differences.

Influence of exposure duration (repeated exposure)

In the $ALDH2^Q/2^Q$ males, the differences in ethanol blood concentrations with respect to day 1 become significantly lower on day 36. In the $ALDH2^Q/2^Q$ females, the differences become significantly lower on day 50. The differences become significantly lower than day 1 starting on day 36 in $ALDH2^R/2^R$ males and on day 64 in $ALDH2^R/2^R$ females. Performing an analysis on the data pooled across all days considered, our test yielded quite significant results ($p < 0.0001$) for each group.

Influence of ALDH2 polymorphism

When comparing results of both genotypes, males showed significant differences only for days 64 and 85. Differences between females were not significant.

Blood ACTDH concentrations for exposure at 3000 ppm (Table 6) (Figure. 4)

A significant association between time and blood acetaldehyde concentrations was not observed. One significant gender difference was observed, which was on day 64 in the group ALDH2^R/2^R. As for polymorphism, females showed significant differences for days 22 and 64, whereas males only showed a significant difference on day 50.

Taken altogether, these results are indicative of a notable high variability between animals with regard to the kinetics of acetaldehyde in blood.

Evaluation of pulmonary toxicity (for both 1000 and 3000 ppm)***Histological analyses***

No adverse effects were observed for any of the groups in the lungs, the bronchus nor the trachea. Some animals, of both the exposed groups and the control groups, showed small spontaneous pulmonary changes like haemorrhage, which is a consequence frequently observed in euthanized rats. Others showed signs of histiocytosis, which is idiopathic and specific to the rat.

Bronchoalveolar lavage

The bronchoalveolar lavage (BAL) analysis showed that even though a sexual dimorphism concerning the number of cells found in the BAL is present, females having less, no significant differences were observed between exposed groups and control groups. Furthermore, no significant differences were observed in the percentage of macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and cilia cells between exposed and control groups (Tables 7-10).

Comparison of blood ethanol concentrations between 1000 ppm and 3000 ppm

Blood ethanol concentrations measured in groups exposed to 3000 ppm were higher than 3 times those measured in groups exposed to 1000 ppm (comparison between same groups); for example, following a 6 hour exposure to 1000 ppm of ethanol, the mean blood ethanol concentration for ALDH2^Q/2^Q males 2 minutes following exposure in day 1 was $66.76 \pm 10.74 \mu\text{M}$, whereas for the same group exposed at 3000 ppm, the blood ethanol concentration was $324.59 \pm 102.57 \mu\text{M}$.

DISCUSSION

The objective sought in completing this study was to confirm the existence of sexual dimorphism, which was already described by Lieber in 2000, in the metabolism of ethanol and acetaldehyde, to investigate whether there is indeed a decreased metabolic rate of acetaldehyde for the genotype lacking ALDH2 enzyme, and further, to evaluate the pulmonary effects of sub chronic ethanol exposure in the rat. We found that exposure duration, which was not part of our initial objectives, and gender had a considerable influence, but no significant impact was found for genetic differences.

Influence of gender

Figure 1 enables us to appreciate the notable discrepancy existing between males and females with respect to the metabolism of ethanol. Moreover, statistical tests confirm this difference as significant, since, apart from the outlier which is day 22 (results from day 22 are abnormally low when compared to days 1 and 36, and so, an external event may be supposed to have deviated our recording), the vast majority of days indicate a significant difference between genders. The higher concentrations of ethanol found in females suggest that the latter metabolize much less rapidly than do males, and consequently, ethanol tends to get accumulated in females' blood leading to elevated concentrations (Lieber, 2000). However, in 1993, Seitz showed that one of the main reasons males show lower blood ethanol concentrations than women is due to their higher gastric ADH activity. Thus, one possible explanation for seeing the same tendencies when ethanol is inhaled would be the higher volume of distribution in males (NIAAA, 1990). Such a discrepancy

was not observed in regard to acetaldehyde as indicate our statistical tests for this substance. Such a discrepancy was not observed in regard to acetaldehyde as indicate our statistical tests for this substance.

Influence of ALDH2 polymorphism

Given that the genetic polymorphism under study focuses solely on ALDH2, an enzyme metabolizing acetaldehyde, and ignores alcohol dehydrogenase, an enzyme metabolizing ethanol, it is certainly not surprising to conclude that there is no significant difference between ethanol concentrations for the two distinct genetic types of ALDH2. Some results turned out to also be significant for concentrations of acetaldehyde. Nonetheless, observations from most days did not yield significant differences because of the great variability observed. The size of the standard deviation values may be justified by the fact that the exposure concentration (especially at 1000 ppm) was too low to generate sufficiently large acetaldehyde concentrations, thus lowering the concentrations to levels very close to the limit of detection and yielding several recordings wrongfully reporting null concentrations. It is therefore impossible, at this point, to confirm the existence of a significant difference in metabolism of acetaldehyde in the two groups considered.

Influence of exposure duration (repeated exposure)

Our statistical analyses enabled us to conclude that indeed time does influence blood ethanol concentrations. In fact, the observed concentrations are negatively correlated with time and thus, these concentrations follow a negative trend with respect to time. This phenomenon may be explained by an adaptation of the organism to a continuous exposure to ethanol through enzymatic induction of

cytochrome P-450 2E1 (Parkinson, 2001; Rowlands et al., 2003). Further, it is suggested that a decrease in enzymatic activity of ADH in the liver may take place (Tarasov & Bankovsky, 2003). Regarding the variation between concentrations of acetaldehyde in time, our study was inconclusive as statistical tests did not deem the differences observed significant.

Evaluation of pulmonary toxicity

Ethanol has often been associated with immune deficiency. It has been shown that chronic alcoholics have a weakened immune system (Szabo, 1999; Carvalho et al., 2005), particularly with neutrophil migration to the inflammation sites and general leukocytes phagocytose. Studies on ethanol inhalation have also proved that although white blood cell count didn't change between exposed and control groups, the proportion of lymphocytes was altered (Marietta et al., 1988). However, our results showed no signs of alterations of the immune system, and because the differences of % eosinophils in the exposed groups are not significantly higher than in the control groups, it is fair to say that there was probably no inflammation in the lungs. The absence of pulmonary toxicity in groups $ALDH2^R/2^R$ could be explained by the lack of pulmonary induction of CYP2E1 when ethanol is inhaled (Zerilli et al., 1995) and also by the very small contribution of pulmonary ADH in ethanol metabolism (Manautou et al., 1992). Both these statements suggest that there is not a great amount of acetaldehyde generated in the lungs and therefore, no local toxic effects are observed.

Comparison of blood ethanol concentrations between 1000 ppm and 3000 ppm

When comparing means of the same groups at 1000 ppm and 3000 ppm, the means measured at 3000 ppm are higher than 3 times those measured at 1000 ppm. These results indicate that enzymes metabolising ethanol reach a level of saturation when exposures are lower than 3000 ppm and that at 3000 ppm, blood ethanol concentrations are too high for the metabolic capacity and therefore, ethanol tends to accumulate in the blood.

Given the large variability of the results obtained for the blood acetaldehyde concentrations between six rats in each group, it is difficult to draw any conclusion as to the influence of different factors on the kinetics of acetaldehyde in the blood.

In conclusion, our results indicate that a subchronic exposure to 3000 ppm is not toxic for the rat lungs and therefore, represents a NOAEL for pulmonary toxicity for the Sprague-Dawley rat.

REFERENCES

- Carvalho, EM., Brito, GAC., Pessoa, BBGP., Ribeiro, RA., Capaz, FR. 2005. Long-term ethanol intoxication reduces inflammatory responses in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:81-89.
- Health Canada (2005). Gasoline with Ethanol: A green alternative [on line] <http://oee.nrcan.gc.ca/Publications/transportation/ethanol-awareness.cfm?Text=N&PrintView=N> (page consulted in December 2005).
- Lieber, C. S. 2000. Ethnic and Gender Differences in Ethanol Metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24(4):417-418.
- Luo, HR., Zhang, YP. 2004. Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2) Polymorphism and Drinking Behavior. *Yi Chuan.* 26 (2):263-266.
- Marietta, CA., Jerrels, TR., Meagher, RC., Karanian, JW., Weoght, FF., Eckardt, MJ. 1988. Effects of long-term inhalation on the immune and hematopoietic systems of the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 12(2):211-214.
- Manautou, JE., Carlson, GP. 1992. Comparison of rat pulmonary and hepatic cytosolic alcohol dehydrogenase activities. *J. Toxicol. Environ. Health.* 35(1):7-18.

- McElroy, MC., Postle, AD., Kelly, FJ. 1992. Catalase, superoxidase dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1117(2):153-158.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) (1990). Alcohol Alert: Alcohol and Women. No. 10, PH 290
- Oyama, T., Isse, T., Kagawa, N., Kinaga, T., Kim, YD., Morita, M., Sugio, K., Weiner, H., Yasumoto, K., Kawamoto, T. 2005. Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the ALDH2 gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. *Front. Biosci.* 10:951-960.
- Parkinson, A. 2001. Biotransformation of xenobiotics. In *Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons*, ed., C.D. Klaassen, 6th ed., pp. 152-156. New York: McGraw-Hill.
- Pastino, GM., Asgharian, B., Roberts, K., Medinsky, MA., Bond, J. 1997. A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:147-157.
- Rowlands, JC., He, L., Badger, TM. 2003. Glucose inhibition of the induction of CYP2E1 mRNA expression by ethanol in FGC-4 cells. *Xenobiotica.* 33(4): 389-397.

- Seitz, HK., Egerer, G., Simanowski, UA., Waldherr, R., Eckey, R., Agarwal, DP., Goedde, HW., von Wartburg, JP. 1993. Human gastric alcohol dehydrogenase activity : Effect of age, sex, and alcoholism. *Gut* 34: 1433-1437.
- Szabo, G. 1999. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol alcohol* 34: 830-841.
- Tarasov, Y., Bankovsky, A.. (2003) Activities of some enzymes and metabolites in rat liver in chronic ethanol inhalation. *European Journal of Biochemistry*. Supplement 1 July: abstract number P4.8-11.
- Tardif, R., Charbonneau, M. 2001. Caractérisation de la toxicocinétique de l'acétaldéhyde et de l'éthanol après inhalation de vapeurs d'éthanol chez le rat. IRSST project #318. Final report submitted as part of the "Research initiatives on toxic substances" program.
- Yang, M., Coles, BF., Delongchamp, R., Lang, NP., Kadlubar, FF. 2002. Effects of the ADH3, CYP2E1, and GSTP1 genetic polymorphism on their expressions in Caucasian lung tissue. *Lung Cancer*. 38(1):15-21.
- Zerilli, A., Lucas, D., Amet, Y., Beauge, F., Volant, A., Floch, HH., Berthou, F., Menez, JF. 1995. Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol. Alcohol.* 30(3):357-65

Table 1. Classification of the 48 rats used in the experiment

	Exposed		Control group	
	Males	Females	Males	Females
ALDH2 ^Q /2 ^Q	6	6	6	6
ALDH2 ^R /2 ^R	6	6	6	6

Table 2. Ethanol (EtOH) and acetaldehyde (ACTDH) concentrations used in the standard curves for blood analyses

Standards	Concentration EtOH (μM)	Concentration ACTDH (μM)
1	13.79	4.01
2	27.59	8.01
3	55.17	13.35
4	110.34	26.70
5	137.93	53.40

Table 3. Means and standard deviations of blood ethanol concentrations measured.

(n = 6) (t = 2 mins) (exposure = 1000 ppm)

Day exposed	Gender	ALDH2 ^Q /2 ^Q	ALDH2 ^R /2 ^R
		Mean ± SD (µM)	
1 ^Q	Males	66.76 ± 10.74	70.38 ± 8.11
	Females	87.6 ± 15.32	90.58 ± 24.33
22	Males	53.6 ± 11.56	57.08 ± 7.78
	Females	62.55 ± 8.18	67.77 ± 12.63
36 ^R	Males	68.14 ± 11.93	55.51 ± 10.81
	Females	78.47 ± 12.66	76.45 ± 13.35
50 ^{QR}	Males	41.90 ± 5.50	47.20 ± 8.01
	Females	58.85 ± 13.65	73.89 ± 14.87
64 ^R	Males	31.94 ± 6.46	32.42 ± 6.36
	Females	48.35 ± 19.24	41.49 ± 4.67
85 ^Q	Males	39.88 ± 7.83	42.07 ± 4.67
	Females	57.27 ± 8.34	50.40 ± 16.17

Q : Significant difference between gender for ALDH2^Q/2^QR : Significant difference between gender for ALDH2^R/2^R

Table 4. Means and standard deviations of blood acetaldehyde concentrations measured. (n = 6) (t = 2 mins) (exposure = 1000 ppm)

Day exposed	Gender	ALDH2 ^Q /2 ^Q	ALDH2 ^R /2 ^R
		Mean ± SD (μM)	
1 _M	Males	2.51 ± 0.34	4.67 ± 1.92
	Females	0.89 ± 0.69	3.80 ± 1.74
22	Males	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.79
	Females	0.00 ± 0.00	0.47 ± 1.15
36	Males	1.23 ± 1.35	1.89 ± 1.48
	Females	1.34 ± 1.48	1.94 ± 1.53
50	Males	1.16 ± 0.94	0.36 ± 0.89
	Females	0.31 ± 0.76	1.45 ± 1.20
64 _F	Males	2.00 ± 1.10	2.27 ± 0.87
	Females	1.75 ± 1.52	3.41 ± 0.95
85	Males	2.01 ± 1.22	0.33 ± 0.82
	Females	1.06 ± 1.22	0.76 ± 1.18

M : Significant difference between ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R for males

F : Significant difference between ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R for females

Table 5. Means and standard deviations of blood ethanol concentrations measured.

(n = 6) (t = 2 mins) (exposure = 3000 ppm)

Day exposed	Gender	ALDH2 ^Q /2 ^Q	ALDH2 ^R /2 ^R
		Mean \pm SD (μ M)	
1 ^R	Males	324.59 \pm 102.57	230.14 \pm 24.36
	Females	306.85 \pm 55.10	386.33 \pm 80.25
22 ^{QR}	Males	231.83 \pm 40.76	230.97 \pm 30.71
	Females	311.40 \pm 22.28	407.25 \pm 189.38
36 ^{QR}	Males	181.00 \pm 43.63	174.63 \pm 34.24
	Females	273.34 \pm 49.74	290.09 \pm 53.46
50 ^{QR}	Males	176.27 \pm 46.20	170.64 \pm 23.42
	Females	241.45 \pm 35.70	285.02 \pm 35.15
64 ^{QR_M}	Males	152.00 \pm 18.60	115.40 \pm 20.15
	Females	205.07 \pm 18.12	222.34 \pm 53.72
85 ^{R_M}	Males	187.49 \pm 32.08	139.70 \pm 12.52
	Females	218.73 \pm 57.98	223.91 \pm 43.33

Q : Significant difference between gender for ALDH2^Q/2^QR : Significant difference between gender for ALDH2^R/2^RM : Significant difference between ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R for males

Table 6. Means and standard deviations of blood acetaldehyde concentrations measured. (n = 6) (t = 2 mins) (exposure = 3000 ppm)

Day exposed	Gender	ALDH2 ^Q /2 ^Q	ALDH2 ^R /2 ^R
		Mean ± SD (µM)	
1	Males	5.37 ± 2.15	4.81 ± 1.65
	Females	5.53 ± 3.47	4.69 ± 2.99
22 _F	Males	5.82 ± 1.78	3.37 ± 2.71
	Females	4.86 ± 2.44	0.62 ± 1.51
36	Males	2.11 ± 1.87	1.82 ± 1.55
	Females	2.79 ± 2.73	3.10 ± 2.16
50 _M	Males	7.19 ± 2.06	3.91 ± 2.41
	Females	5.80 ± 2.41	5.92 ± 3.73
64 ^R _F	Males	0.87 ± 1.35	7.71 ± 7.51
	Females	2.76 ± 2.33	21.14 ± 8.76
85	Males	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Females	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

R : Significant difference between gender for ALDH2^R/2^R

M : Significant difference between ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R for males

F : Significant difference between ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R for females

Table 7. BAL's cellular content in males ALDH2^Q/2^Q (1000 ppm exposure). (Results expressed in percent total white cell count)

Control group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
1	0.837	95,3	3,8	0,9	0	1,7
2	1.118	93,6	3,8	2,6	0	0
3	1.420	97,8	2,2	0	0	6,5
4	1.752	76,4	23,5	0,1	0	3,2
5	3.102	89,6	10,0	0,4	0	0
6	1.899	79,9	17,1	3,1	0	1,0
Mean \pm SD	1.688 \pm 0.796	88,8 \pm 8.81	10,1 \pm 8.57	1,2 \pm 1.22	0 \pm 0	2,1 \pm 2.45
Exposed group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
7	1.260	85,1	12,4	2,5	0	3,5
8	1.234	90,8	4,9	4,1	0,3	2,6
9	1.108	97,1	1,5	1,5	0	4,4
10	1.464	88,0	10,3	1,1	0,6	1,4
11	1.547	87,2	3,8	9,0	0	7,5
12	4.112	94,4	4,6	1,0	0	0,8
Mean \pm SD	1.788 \pm 1.15	90,4 \pm 4.65	6,2 \pm 4.16	3,2 \pm 3.18	0,1 \pm 0.245	3,4 \pm 2.45

Table 8. BAL's cellular content in females ALDH2^Q/2^Q (1000 ppm exposure).

(Results expressed in percent total white cell count)

Control group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
13	0.960	94,7	3,3	2,0	0	6,7
14	2.015	96,1	2,8	1,1	0	0
15	0.552	94,6	4,8	0,7	0	9,5
16	0.863	96,7	2,5	0,8	0	7,1
17	1.427	89,2	9,6	1,2	0	1,2
18	1.553	74,1	22,8	3,1	0	0,3
Mean \pm SD	1.228 \pm 0.534	90,9 \pm 8.57	7,6 \pm 7.84	1,5 \pm 0.980	0 \pm 0	4,1 \pm 4.16
Exposed group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
19	0.878	90,6	8,1	1,3	0	3,6
20	0.817	92,0	5,0	3,0	0	1,3
21	1.272	94,7	3,3	1,3	0,8	3,8
22	0.805	90,9	8,7	0,5	0	9,8
23	0.861	95,4	3,0	1,6	0	0,2
24	1.094	92,0	6,0	1,4	0,5	0,8
Mean \pm SD	0.955 \pm 1.88	92,6 \pm 1.96	5,7 \pm 2.45	1,5 \pm 0.735	0,2 \pm 0.245	3,2 \pm 3.43

Table 9. BAL's cellular content in males ALDH2^R/2^R (1000 ppm exposure). (Results expressed in percent total white cell count)

Control group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
25	1.636	93,2	5,4	1,4	0	13,5
26	2.694	97,9	0	2,1	0	0,9
27	1566	96,3	1,9	1,9	0	4,0
28	1.050	91,9	7,2	0,9	0	1,3
29	2.321	87,3	10,4	2,2	0	1,3
30	1.152	77,1	13,0	10,0	0	1,3
Mean ± SD	1.736 ± 0.650	90,6 ± 7.59	6,3 ± 4.90	3,1 ± 3.43	0 ± 0	3,7 ± 4.90
Exposed group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
31	2.174	97,6	2,4	0	0	2,0
32	3.604	98,3	0,4	1,3	0	2,4
33	0.864	98,0	1,5	0,5	0	1,7
34	1.466	82,9	11,0	6,2	0	0,5
35	0.805	77,7	14,7	7,2	0,3	1,4
36	2.157	74,5	19,7	5,9	0	0
Mean ± SD	1.845 ± 1.05	88,2 ± 11.0	8,3 ± 8.08	3,5 ± 3.18	0,1 ± 0.245	1,3 ± 0.980

Table 10. BAL's cellular content in females ALDH2^R/2^R (1000 ppm exposure) (1000 ppm exposure). (Results expressed in percent total white cell count)

Control group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
37	1.659	98,6	0,7	0,7	0	0
38	1.222	93,5	5,8	0,6	0	0,8
39	0.857	98,3	1,7	0,0	0	2,8
40	0.774	92,8	5,6	1,6	0	0,6
41	1.613	93,3	6,3	0,4	0	0,6
42	1.615	89,0	6,4	4,3	0,3	0
Mean \pm SD	1.289 \pm 0.399	94,3 \pm 3.67	4,4 \pm 2.45	1,3 \pm 1.47	0,1 \pm 0.245	0,8 \pm 0.980
Exposed group (rat #)	Cell count (Million)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils	Cilia cells
43	1.267	94,0	4,7	1,3	0	0,6
44	0.923	97,2	1,0	1,8	0	2,1
45	1.181	99,5	0,5	0,0	0	0,5
46	0.736	81,1	18,9	0,0	0	2,2
47	1.456	96,1	1,2	2,7	0	0
48	2.009	98,4	0	1,6	0	1,2
Mean \pm SD	1.262 \pm 0.446	94,4 \pm 6.86	4,4 \pm 7.35	1,2 \pm 0.980	0 \pm 0	1,1 \pm 0.980

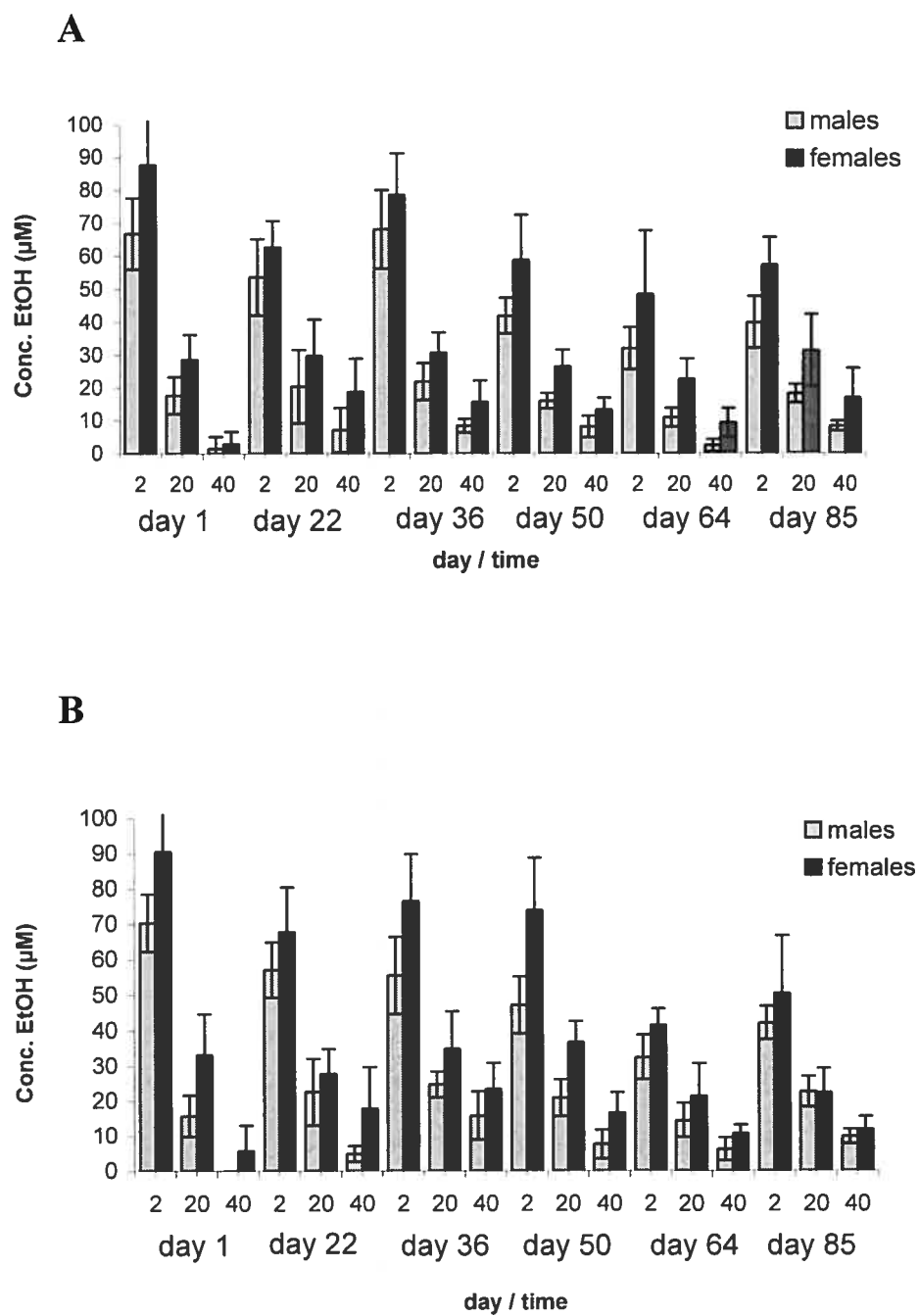


Figure 1. Blood ethanol concentrations for groups $\text{ALDH2}^{\text{Q}/2^{\text{Q}}}$ (A) and groups $\text{ALDH2}^{\text{R}/2^{\text{R}}}$ (B) in males (blue) and females (red) at different time points (2, 20 and 40 min post-exposure). (n = 6) (1000 ppm)

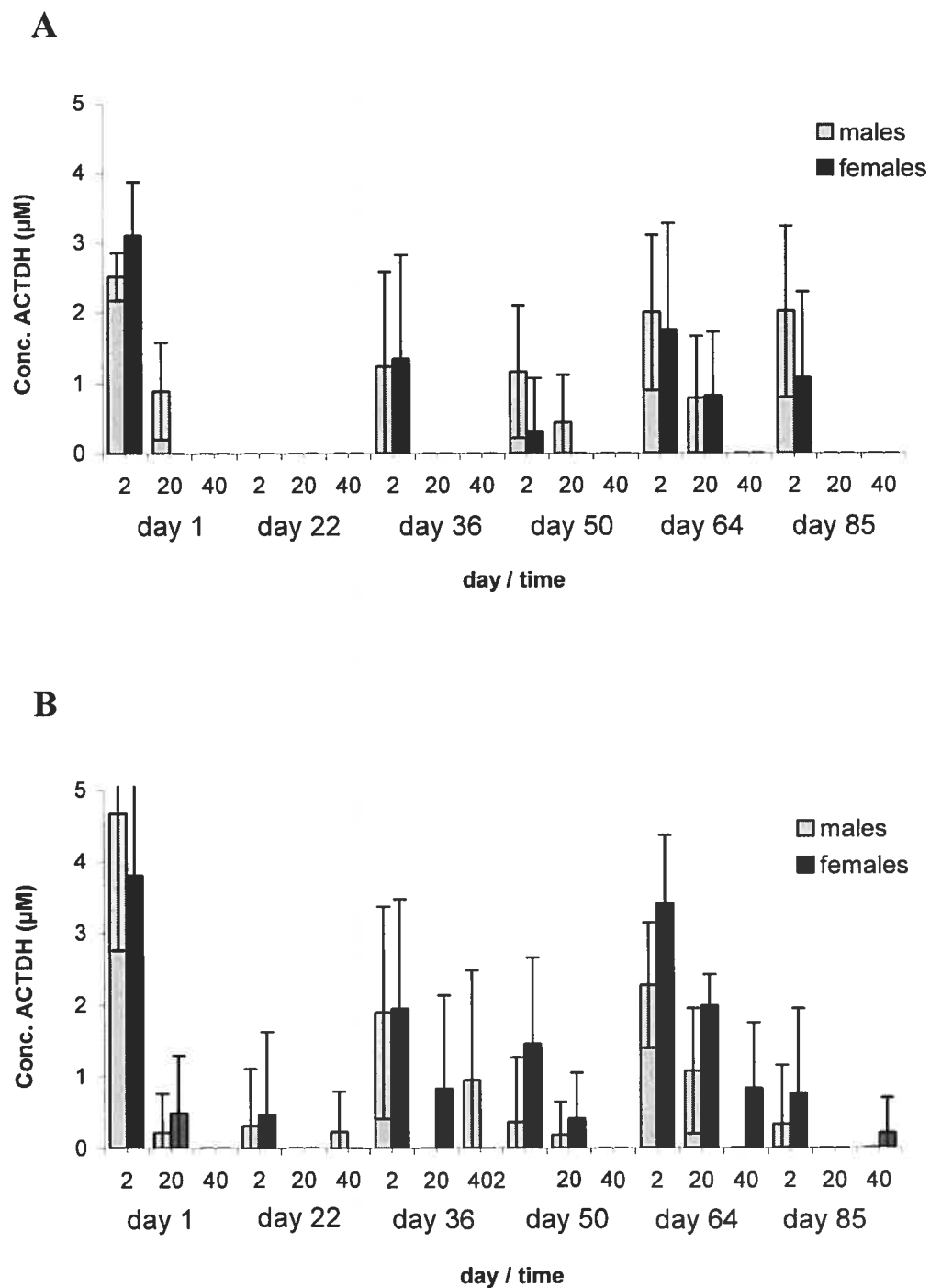


Figure 2. Blood acetaldehyde concentrations for groups $\text{ALDH2}^{\text{Q}}/\text{2}^{\text{Q}}$ (A) and groups $\text{ALDH2}^{\text{R}}/\text{2}^{\text{R}}$ (B) in males (blue) and females (red) at different time points (2, 20 and 40 min post-exposure). (n = 6) (1000 ppm)

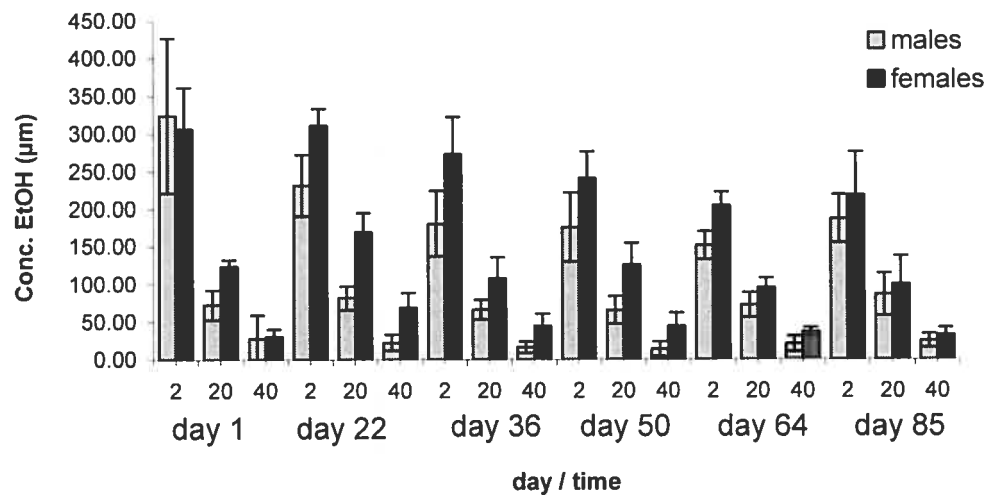
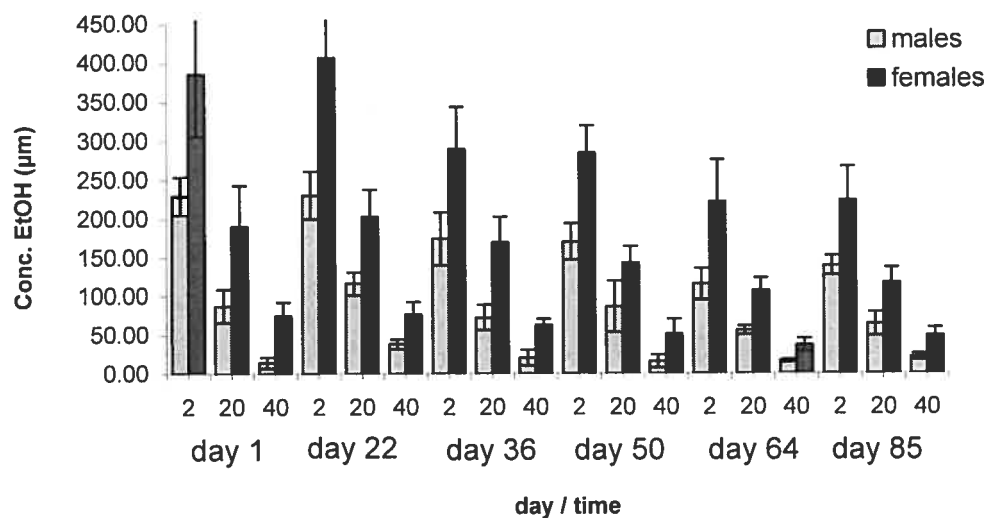
A**B**

Figure 3. Blood ethanol concentrations for groups $\text{ALDH2}^{\text{Q}}/\text{2}^{\text{Q}}$ (A) and groups $\text{ALDH2}^{\text{R}}/\text{2}^{\text{R}}$ (B) in males (blue) and females (red) at different time points (2, 20 and 40 min post-exposure). (n = 6) (3000 ppm)

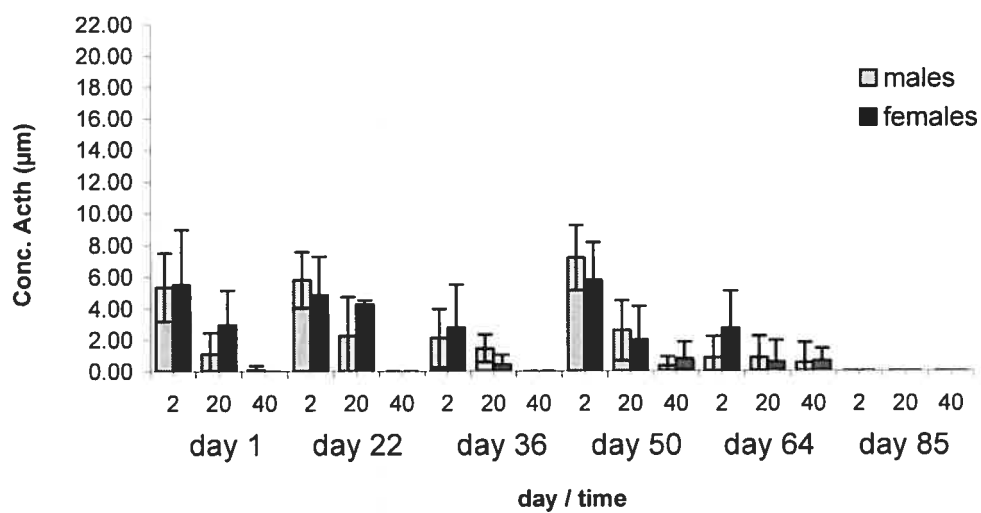
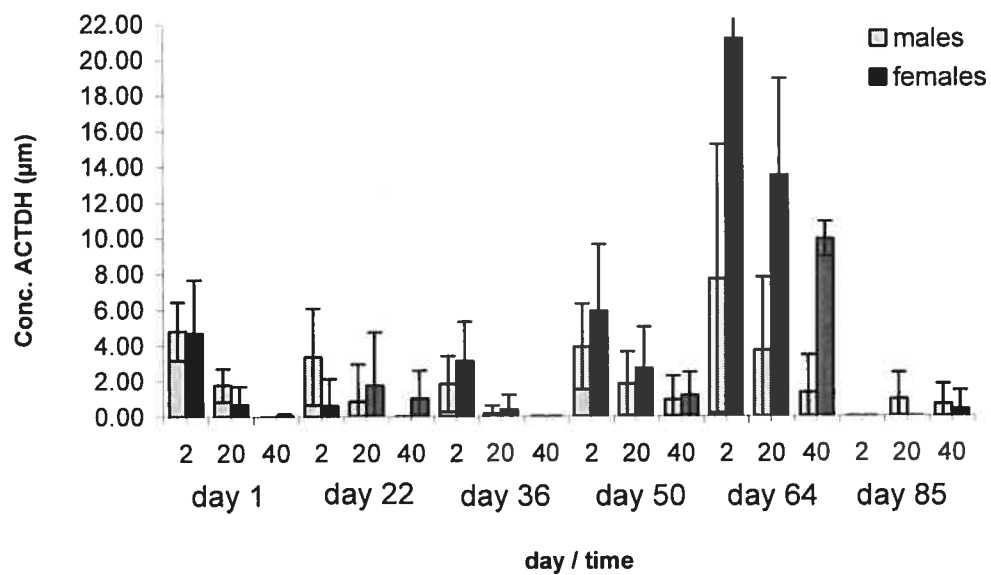
A**B**

Figure 4. Blood acetaldehyde concentrations for groups $\text{ALDH2}^{\text{Q}}/\text{2}^{\text{Q}}$ (A) and groups $\text{ALDH2}^{\text{R}}/\text{2}^{\text{R}}$ (B) in males (blue) and females (red) at different time points (2, 20 and 40 min post-exposure). (n = 6) (3000 ppm)

**CHAPITRE QUATRIÈME :
DISCUSSION ET CONCLUSION**

4.1. But de l'étude

Notre étude a permis d'approfondir les données concernant la cinétique et les effets de l'inhalation d'éthanol chez le rat exposé de façon subchronique dans le but éventuel de mieux connaître ces effets chez l'humain. Cette étude était nécessaire, car très peu d'études existent dans la littérature scientifique à ce sujet et l'exposition humaine involontaire augmentera dans un futur rapproché à cause des projets de mélanges éthanol-essence. Il est donc important de déterminer si cette utilisation d'éthanol est et sera sécuritaire chez l'humain.

4.2. Résultats des différents objectifs à l'étude

Tous les chiffres appuyant les informations/conclusions qui suivent sont discutés dans l'article présenté au chapitre troisième. Il ne s'agit pas ici de reprendre ces chiffres, mais plutôt de résumer les observations au cours de l'étude en donnant les explications s'y rapportant.

4.2.1. Influence de la durée d'exposition

Les résultats obtenus aux trois différents temps de prises de sang des différentes journées de prises de sang ont clairement démontré que l'EtOH était efficacement métabolisé et que les concentrations sanguines baissaient rapidement tant chez les rats mâles que chez les femelles normaux que chez les rats déficients. Pour ce qui est de l'ACTDH, certaines journées seulement donnaient des diminutions statistiquement significatives dans le temps. De plus, les analyses sanguines faites

à différentes journées d'exposition (en comparant les mêmes temps de prises de sang) a permis de conclure que les concentrations sanguines d'EtOH diminuent avec le temps, suggérant une augmentation de l'activité enzymatique dans le temps, qui est probablement due à une induction enzymatique, comme l'ont démontré plusieurs auteurs. L'ACTDH n'a pas montré de différences significatives lors de cette analyse.

4.2.2. Influence du dimorphisme sexuel

Des différences significatives ont été observées entre mâles et femelles pour les concentrations sanguines d'EtOH, les femelles ayant des concentrations plus élevées, dans presque toutes les journées de prises de sang. Il est donc possible de conclure que le genre a une influence sur le métabolisme de l'EtOH, les mâles métabolisant l'EtOH plus efficacement que les femelles. Aucune différence significative n'a été observée pour les concentrations sanguines d'ACTDH.

4.2.3. Influence du polymorphisme de l'ALDH2

L'analyse des concentrations sanguines d'EtOH n'a donné aucune différence significative entre les groupes ayant une activité normale (rapide) pour l'ALDH2 et ceux ayant une activité nulle pour ce même enzyme. Ces résultats ne sont pas surprenant, car l'enzyme à l'étude métabolise l'ACTDH et le métabolisme de l'EtOH est, d'après nos connaissances, totalement indépendant de l'ALDH2. Nous nous attendions à voir des différences significatives pour les concentrations sanguines d'ACTDH entre les groupes ayant l'enzyme et ceux déficients, mais l'étude n'a

montré aucune différence significative à cet égard. Ces résultats pourraient s'expliquer de trois façons :

1. Par la petite taille de l'échantillon ($n = 6$) ;
2. Par une grande variété interindividuelle, car les sujets ayant une activité rapide pour l'enzyme ne métabolisent pas nécessairement l'ACTDH au même taux ;
3. Par les données de la littérature, qui indiquent une possible liaison de l'ACTDH aux protéines plasmatiques, ce qui pourraient masquer l'impact du polymorphisme sur la concentration sanguine d'ACTDH.

Notre étude ne nous permet donc pas de conclure que des différences métaboliques existent entre les deux groupes.

4.2.4. Évaluation de la toxicité pulmonaire

Les lavages bronchoalvéolaires ont été effectués dans le but de voir s'il y avait des différences de proportions d'éosinophiles entre les différents groupes. La présence d'éosinophiles est un indicateur de la présence d'inflammation pulmonaire. Aucune différence significative n'a cependant été notée, ce qui indique qu'il n'y a probablement pas eu d'inflammation pulmonaire suite à l'exposition à des vapeurs d'EtOH. L'absence de différences au niveau des coupes histologiques des différentes régions pulmonaires analysées confirme les données précédentes et indique que l'exposition n'a pas causé de lésions dans les régions analysées (trachée, bronches, alvéoles).

4.2.5. Comparaison entre les concentrations sanguines à 1000 ppm et 3000 ppm

La comparaison entre les moyennes des concentrations sanguines mesurées chez les groupes exposés à 1000 ppm et ceux exposés à 3000 ppm (comparaison entre mêmes groupes) donnent un ratio plus grand que 3, c'est-à-dire que les concentrations sanguines des groupes exposés à 3000 ppm sont plus que 3 fois plus élevées que celles des groupes exposés à 1000 ppm. Ce phénomène peut être expliqué par une saturation des enzymes métabolisant l'éthanol. Donc, lors d'une exposition à 3000 ppm, les concentrations sanguines d'éthanol dépassent la capacité métabolique maximale des enzymes, ce qui se traduit par une accumulation d'éthanol dans le sang.

En conclusion, suite à nos observations, il nous est possible de conclure qu'une exposition subchronique à 3000 ppm représente un NOAEL (animal) pour la toxicité pulmonaire chez le rat. Lorsqu'on extrapole chez l'humain en utilisant les formules de l'U.S. EPA, on obtient :

$$1) \text{NOAEL}_H (\text{mg}/\text{m}^3) = \text{NOAEL}_{ADJ} (\text{mg}/\text{m}^3) \times \text{FAD}$$

où NOAEL_H : NOAEL extrapolé à l'humain

NOAEL_{ADJ} : NOAEL ajusté

FAD : facteur d'ajustement dosimétrique

$$2) \text{NOAEL}_{ADJ} (\text{mg}/\text{m}^3) = \text{NOAEL}_A (\text{mg}/\text{m}^3) \times T$$

où $\text{NOAEL}_A (\text{mg}/\text{m}^3)$: NOAEL animal (3000 ppm = 5640 mg/m^3)

T : temps d'exposition = $6\text{h} / 24\text{h} \times 5\text{j} / 7\text{j} = 0.1786$

Donc, $\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} (\text{mg}/\text{m}^3) = 1007.14 \text{ mg}/\text{m}^3$

$$3) \text{FAD} = (\text{Va}_A / \text{Sa}_A) / (\text{Va}_H / \text{Sa}_H)$$

où Va_A : ventilation alvéolaire chez le rat calculée comme suit :

$$\text{Ln} (\text{Va}_A) = b_0 + b_1 \text{Ln} (\text{PC})$$

Où b_0 : valeur « intercept » = - 0.578 (valeur donnée par l'U.S. EPA)

b_1 : valeur « coefficient » = 0.821 (valeur donnée par l'U.S. EPA)

PC : poids corporel moyen du rat = 0.236 kg (moyenne exposition subchronique)

Donc, $\text{Va}_a = 0.17 \text{ m}^3 / \text{jour}$

Sa_A : aire de la surface respiratoire totale chez le rat = 0.343 m^2

Va_H : ventilation alvéolaire de l'humain = $20 \text{ m}^3 / \text{jour}$

Sa_H : aire de la surface respiratoire totale chez l'humain = 54.340 m^2

Donc, $\text{FAD} = 1.35$

Enfin, Le $\text{NOAEL}_H = 1356.13 \text{ mg}/\text{m}^3$ (ou 721 ppm)

CHAPITRE CINQUIÈME :
BIBLIOGRAPHIE

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (2001). TLVs and BEIs for Chemical substances and physical agents. Cincinnati: OH

Aranyi C, O'Shea WJ, Graham JA, Miller FJ (1986). The effects of inhalation of organic chemical air contaminants on murine lung host defenses. *Fundam Appl Toxicol* 6(4): 713-20

Badger TM, Huang J, Ronis M, Lumpkin CK (1993). Induction of cytochrome P450 2E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP 2E1 gene when blood alcohol concentrations are high. *Biochem Biophys Res Commun* 190(3): 780-5

Bankowski E, Pawlicka E, Sobolewski K (1993). Liver collagen of rats submitted to chronic intoxication with acetaldehyde. *Mol Cell Biochem* 121: 37-43

Bannister P, Lowosky MS (1987). Ethanol and hypogonadism. *Alcohol Alcohol* 22(3): 213-217

Baraona E, Di Padova C, Tabasco J, Lieber CS (1987). Red blood cells: a new major modality for acetaldehyde transport from liver to other tissues. *Life Sci* 40: 253-58

Benz R, Janko K, Länger P (1980). Pore formation by the matrix protein (porin) to *Escherichia coli* in planar bilayer membranes. *Ann NY Acad Sci* 358: 13-24

Bittersohl G (1974). Epidemiologic investigations on cancer incidence in workers contacted by acetaldol and other aliphatic aldehydes. *Arch Geschwulstforsch* 43: 172-6

Blakley PM, Scott WR Jr (1984). Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. Pharmacokinetics of the placental transfer of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 72: 364-71

Blot WJ (1992). Alcohol and cancer. *Cancer Res* 52: 2119s-2123s

Boffeta p, Garfinkel L (1990). Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidemiology* 1: 342-348

Booze TF, Oehme FW (1986). An investigation of metaldehyde and acetaldehyde toxicities in dogs. *Fundam Appl Toxicol* 6: 440-6

Brien JF, Loomis CW (1983). Pharmacology of acetaldehyde. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 1-22

Cancer Research UK (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *BJC* 87: 1234-1245

Choi WS, Murthy G GK, Edwards DA, Langer R, Klibanov AM (2001). Inhalation delivery of proteins from ethanol suspensions. *Proc Natl Acad Sci* 98(20): 11103-07

Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z (2003). Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas. *Dig Dis Sci* 48(7): 1230-3

Colditz GA, Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Gordis E, Willett WC (1991). Alcohol intake in relation to diet and obesity in women and men. *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 49-55

Cooper DE, Goff Jr. DC, Bell RA, Zaccaro D, Mayer-Davis EJ, Karter AJ (2002). Is Insulin Sensitivity a Causal Intermediate in the Relationship Between Alcohol Consumption and Carotid Atherosclerosis?: The Insulin Resistance and Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 25: 1425-1431

Cornish HH, Adefuin J (1966). Ethanol potentiation of halogenated aliphatic solvent toxicity. *Am Ind Hyg Assoc J* 27(1): 57-61

Edwards DA, Valente AX, Man J, Tsapis N (2003). Recent Advances Related to the Systemic Delivery of Therapeutic Molecules by Inhalation. Division of Engineering and Applied Sciences, Harvard University

EHC (Environmental Health Criteria) (1995). Environmental health criteria 167: Acetaldehyde. [En ligne] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc167.htm>
(Page consultée en décembre 2005)

Emanuele MA, Emanuele N (2001). Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 25(4): 282-7

Fentiman IS (2000). Future prospects for the prevention and cure of breast cancer. *Eur J Cancer* 36(9): 1085-1088

Feron V, Krusysse A, Woutersen R (1982). Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18: 13-31

Folland DS, Schaffner W, Ginn HE, Crofford OB, McMurray DR (1976). Carbon tetrachloride toxicity potentiated by isopropyl alcohol. Investigation of an industrial outbreak. *JAMA* 236(16): 1853-6

Forsell L (1981). Studies on the metabolic effects of ethanol in rat, dissertation. 54 Opuscula medica, Supplementum LV. Germany: Stockholm.

Goist KC, Sutker PB (1985). Acute alcohol intoxication and body composition in women and men. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 811-814

Gubitosi-Klug RA, Gross RW (1996). Fatty acid ethyl esters, nonoxidative metabolites of ethanol, accelerate the kinetics of activation of the human brain delayed rectifier K⁺ channel, Kv1.1. *J Biol Chem* 271(51): 32519-22

Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F (1996). Alcohol consumption, serum low density lipoprotein cholesterol concentration, and risk of ischaemic heart disease: six year follow up in the Copenhagen male study. *BMJ* 312(7033): 736-741

Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM (2003). Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(13): 7919-24

Heinemann L, Klappoth W, Rave K, Hompesch B, Linkeschowa R, Heise T (2000) Intra-individual variability of the metabolic effect of inhaled insulin together with an absorption enhancer. *Diabetes Care* 23(9): 1343-7

HSDB (Hazardous Substances Data Bank) (1994). MEDLARS Online Information Retrieval System, National Library of Medicine.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1985). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Alkyl Compounds, Aldehydes, Epoxides and Peroxides. Vol. 36. France: Lyon. World Health Organization

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1988). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Alcohol Drinking. Vol. 44. pp. 251-259. France: Lyon. World Health Organisation

Igali S, Gazso L (1980). Mutagenic effects of alcohol and acetaldehyde on *Escherichia coli*. *Mutat Res* 74: 209-10

INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) (2001). Alcool : Effets sur la santé. pp. 1-9. France: Paris

Johnston DE, Chiao YB, Gavaler JS, Van Thiel DH (1981). Inhibition of testosterone synthesis by ethanol and acetaldehyde. *Biochem Pharmacol* 30(13): 1827-1830

Jones AW, Hahn R, Stalberg HP (1990). Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood ; inter and intra individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scand J Clin Lab Invest* 50: 775-780

Jones AW, Hahn R, Stalberg HP (1992). Pharmacokinetics of ethanol in plasma and whole blood ; estimation of total body water by the dilution principle. *Eur J Clin Pharmacol* 42: 445-448

Jones AW, Jönsson KA (1994). Food-induced lowering of blood-ethanol profiles and increased rate of elimination immediately after a meal. *Journal of Forensic Sciences* 39(4): 1084-1093

Jones AW, Jönsson KA, Kechagias S (1997). Effect of high-fat, high-protein, and highcarbohydrate meals on the pharmacokinetics of a small dose of alcohol. *Br J Clin Pharmacol* 1997, 44 : 521-526

Klaassen CD, Plaa GL (1966). Relative effects of various chlorinated hydrocarbons on liver and kidney function in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 9(1): 139-51

Kruysse A, Feron VJ, Til HP (1975). Repeated exposure to acetaldehyde vapor. Studies in Syrian golden hamsters. *Arch Environ Health* 30: 449-52

Kutob SD, Plaa GL (1962). The effect of acute ethanol intoxication on chloroform-induced liver damage. *J Pharmacol Exp Ther* 135: 245-51

Lam CL, Casanova M, Heck H (1986). Decreased extractibility of DNA and proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fundam Appl Toxicol* 6: 541-50

Lamboeuf Y, Latge C, Roumec C, De Saint Blanquat G (1987). Ethanol tolerance in the rat after inhalation of acetaldehyde for a period of 21 days. *Alcohol Alcohol* 22: 441-7

Leo MA, Lieber CS (1982). Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury. *N Engl J Med* 307(10): 597-601

Levitt MD, Li R, DeMaster EG, Elson M, Furne J, Levitt DG (1997). Use of measurements of ethanol absorption from stomach and intestine to assess human ethanol metabolism. *Am J Physiol* 273: G951-7

Lieber CS (1991). Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 15(1): 573-92

Lieber CS (1997). Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 77: 517-544

Lieber CS (2000). Ethnic and Gender Differences in Ethanol Metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 24(4): pp 417-418

Manno M, Rezzadore M, Grossi M, Sbrana C (1996). Potentiation of occupational carbon tetrachloride toxicity by ethanol abuse. *Hum Exp Toxicol* 15(4): 294-300

Matysiak-Budnik T, Jokelainen K, Karkkainen P, Makisalo H, Ohisalo J, Salaspuro M (1996). Hepatotoxicity and absorption of extrahepatic acetaldehyde in rats. *J Pathol* 178: 469-474

Mello NK, Mendelson JH, Teoh SK (1993). An overview of the effects of alcohol on neuroendocrine function in women. In: Zakhari S, ed. Alcohol and the Endocrine System. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research. Monograph No. 23. NIH Publication No. 93-3533. Bethesda, MD: the Institute. pp. 139-169.

Mikhailidis DP, Jenkins WJ, Barradas MA, Jeremy JY, Dandona P (1986). Platelet function defects in chronic alcoholism. *BMJ* 293(6549): 715-8

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) (1990). Alcohol Alert: Alcohol and Women. No. 10, PH 290

Nicholls R, De Jersey J, Worrall S, Wilce P (1992). Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. *Int J Biochem* 24: 1899-906

Obe G, Beek B (1979). Mutagenic activity of aldehydes. *Drug Alcohol Depend* 4: 91-94

Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT (2002). Binge Ethanol Exposure in Adult Rats Causes Necrotic Cell Death. *Alcohol Clin Exp Res* 26(4): 547-557

Ohnishi K, Iida S, Iwama S, Goto N, Nomura F, Takashi M, Mishima A, Kono K, Kimura K, Musha H, Kotota K, Okuda K (1982). The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: relation to hepatitis B surface antigen carriage. *Cancer* 49: 672-677

Padmanabhan R, Sreenathan RN, Singh S (1983). Studies on the lethal and teratogenic effects of acetaldehyde in the rat. *Congenit Anom* 23: 13-23

Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xénobiotics. In *Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons*, ed., C.D. Klaassen, 6th ed., pp. 152-156. New York: McGraw-Hill.

Petersen DR, Atkinson N, Hjelle JJ (1982). Increase in hepatic microsomal oxidation by a single dose of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 221: 275-281

Phillips SC (1987). Can brain lesions occur in experimental animals by administration of ethanol or acetaldehyde? *Acta Med Scand* 71: 67-72

Ressources naturelles Canada (2005). Énergie consommée à des fins personnelles (Carburants) [En ligne]

<http://oee.nrcan.gc.ca/transport/personnel/carburants.cfm?attr=8#ethanol>

(Page consultée en décembre 2005)

Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ (1994). Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1064-1071

Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE (1995). Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem* 270(50): 29632-5.

Romero P, Wagg J, Green ML, Kaiser D, Krummenacker M, Karp PD (2004). Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biology* volume 6, issue 1: R2

Rowlands JC, He L, Badger TM (2003). Glucose inhibition of the induction of CYP2E1 mRNA expression by ethanol in FGC-4 cells. *Xenobiotica*. 33(4): 389-397

Saldiva PHN, Do Rio Caldeira MP, Massad CW, Calheiros DF, Cardoso LMN, Bohm GM, Saldiva CD (1985). Effects of formaldehyde and acetaldehyde inhalation on rat pulmonary mechanics. *J Appl Toxicol* 5(5): 288-92

Santé Canada (2005). L'essence à l' thanol : Un choix écologique [En ligne]
<http://oee.nrcan.gc.ca/Publications/transports/ethanol-choix-ecologique.cfm?Text=N&PrintView=N> (Page consultée en décembre 2005)

Schopf RE, Tromperer M, Bork K, Morsches B (1985). Effects of ethanol and acetaldehyde on phagocytic functions. *Arch Dermatol Res* 277(2): 131-7

Seitz HK, Egerer G, Simanowski UA, Waldherr R, Eckey R, Agarwal DP, Goedde HW, von Wartburg JP (1993). Human gastric alcohol dehydrogenase activity : Effect of age, sex, and alcoholism. *Gut* 34: 1433-7

Seitz HK, Simanowski UA (1988). Alcohol and carcinogenesis. *Annu Rev Nutr* 8: 99-119

Silvers JM, Tokunaga S, Berry RB, White AM, Matthews DB (2003). Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* 43(3): 275-84

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279(7): 535-40

THE MERCK INDEX (1989). Budavari S, 11th ed., p. 594 #3716. Ethyl Alcohol. New Jersey: Rahway

Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Clary JJ (1988). Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a 4-week drinking-water study in rats. *Fundam Chem Toxicol* 26(5): 447-52.

U.S. Department of energy (2005). Energy Efficiency and Renewable Energy (ABC's of Biofuel) [En ligne] http://www.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#feed (Page consultée en décembre 2005)

U.S. EPA (Environmental Protection Agency) (1994). Chemical summary for acetaldehyde. [En ligne] http://www.epa.gov/chemfact/s_acetal.txt (Page consultée en décembre 2005)

U.S. EPA (Environmental Protection Agency) (1994). Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry.

Veghelyi PV, Osztovcics M (1978). The alcohol syndromes: the intrarecombigenic effect of acetaldehyde. *Experientia* 34: 195-96

Verschueren K (1983). Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp. 139-41

Wallgren H (1970). Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: Effect on biological membranes. In: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Vol 1: pp. 161-188

Westcott JY, Weiner H, Schultz J, Myers RD (1980). *In vivo* acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochem Pharmacol* 29: 411-17

Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ (1986). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. Carcinogenicity study. *Toxicology* 41(2): 213-31

Wright HI, Gavaler JS, Van Thiel D (1991). Effects of alcohol on the male reproductive system. *Alcohol Health Res World* 15(2): 110-114

Yamashita H, Kaneyuki T, Tagawa K (2001). Production of acetate in the liver and its utilization in peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1532(1-2): 79-87

Zerilli A, Lucas D, Amet Y, Beauge F, Volant A, Floch HH, Berthou F, Menez JF (1995). Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol Alcohol* 30(3): 357-65